

Aus der Klinik für Innere Medizin II- Gastroenterologie, Hepatologie, Endokrinologie,  
Diabetologie und Ernährungsmedizin  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. Frank Lammert

**Beiträge zum Verständnis der Heterogenität hepatischer Makrophagen unter  
besonderer Berücksichtigung der Kupfferschen Zellen**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2019

vorgelegt von: Christoph Eckert  
geb. am: 29.01.1992 in Neunkirchen Saar

---

Tag der mündlichen Prüfung: 16.07.2020

Dekan: Prof. Dr. Michael Menger

Erstgutachterin: Prof. Dr. Dr. Veronika Lukacs-Kornek

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Sigrun Smola

Drittgutachter: Prof. Dr. Jonel Trebicka

*„To kill an error is as good a service as, and sometimes even better than, the establishing of a new truth or fact“*

Charles Darwin

# Inhalt

1. Abkürzungen .....	6
2. Zusammenfassung .....	7
3. Einleitung und Fragestellung .....	8
3.1 Systematik der Makrophagen .....	8
3.1.1. Der Begriff der „Makrophage“ .....	8
3.1.2. Das retikuloendotheliale System .....	10
3.1.3. Das mononukleäre Phagozytensystem .....	11
3.1.4. Ein modernes System der Makrophagen .....	13
3.2. Organresidente Makrophagen: Allgemeine Merkmale .....	15
3.2.1 Kupffersche Zellen.....	17
3.3. Funktionelle Aspekte der Makrophagenheterogenität.....	18
3.4. Rolle und Herkunft der Makrophagen bei entzündlichen Lebererkrankungen .....	20
3.4.1. Akute Entzündungen der Leber .....	20
3.4.2. Chronische Entzündungen der Leber .....	23
3.5. Fragestellung der Arbeit.....	25
4. Material und Methoden .....	26
4.1 Puffer und Reagenzien .....	26
4.1.1. Puffer und Lösungen .....	26
4.1.2. Enzyme .....	27
4.1.3. Antikörper .....	27
4.1.4. Selbst hergestellte Lösungen .....	28
4.2. Tiermodelle .....	29
4.2.1. Allgemeines .....	29
4.2.2. Anmerkungen zur Anatomie der Maus.....	29
4.2.3. sublethale Bestrahlung .....	29
4.2.4. Durch hitzeinaktiverte Propionibacterium acnes induzierte Hepatitis .....	31
4.2.5. NASH durch methionin- und cholindefiziente Diät .....	34
4.2.6. Homozygote BATF3-Knockoutmäuse.....	35
4.3 Zellkulturtechniken.....	35
4.3.1. Anlage einer Primärkultur der Leber .....	35
4.3.2. RAW-Makrophagen .....	36

4.4. histologische Techniken .....	37
4.4.1. Anfertigen und Färben von Paraffinschnitten.....	37
4.4.2. Anfertigen und Färben von Kryoschnitten.....	37
4.5. Durchflusszytometrie .....	38
4.5.1. Herstellen einer Einzelzellsuspension aus Geweben .....	38
4.5.2. MACS .....	39
4.5.3. Analyse der Zellkultur .....	40
4.5.4. Präparation der Probe .....	41
4.6. Analysen, Berechnungen, Software.....	43
4.6.1. Analyse durchflusszytometrischer Daten.....	43
4.6.2. Analyse von Bilddaten .....	44
5. Ergebnisse.....	45
5.1. PDCA-1 wird von Kupfferzellen exprimiert.....	45
5.2. ESAM trennt KCs in zwei distinkte Gruppen.....	49
5.3. Die Expression von ESAM hängt nicht von der im Verdau eingesetzten Protease ab.....	51
5.4. PDCA-1 und ESAM-Expression in anderen Organen.....	53
5.5. Expressionsprofile von ESAM pos. und ESAM neg. Kcs.....	56
5.6. Unterschiedliche Strahlensensibilität der beiden Populationen .....	62
5.7. Kongene Knochenmarkstransplantation .....	63
5.8. Isolationsversuche mittels MACS .....	65
5.9. Versuch der Vereinzelung der Populationen durch Kultur.....	68
5.10. RAW-Makrophagen als potentiell in-vitro-System .....	71
5.11. Unterschiede im Zytokinsekretionsverhalten der Subpopulationen.....	72
5.11. Etablierung eines In-vivo-Systems zur Untersuchung der Kupfferzellaktivierung .	74
5.12. Veränderungen des Makrophagenkompartiments bei P.acnes induzierter Hepatitis.....	78
5.13. Einfluss einer Splenektomie auf die P.acnes medierte Hepatitis .....	80
5.14. Veränderungen der Makrophagenzusammensetzung bei MCD-induzierter Hepatitis.....	82
5.15. Abhängigkeit der Makrophagenzusammensetzung vom BATF3-Status .....	84
5.16. Nutzung der UV-Fluoreszenz von Schaumzellen zur Quantifikation der Steatohepatitis .....	85
6. Diskussion .....	88

6.1. PDCA-1 als Makrophagenmarker in Gesundheit und Krankheit.....	88
6.2. Beiträge zum Verständnis der Kupfferzellheterogenität .....	90
6.3. Einordnung der Kupfferschen Zellen sensu strictu ins myeloische Kompartiment der Leber .....	91
6.4. Numerische Veränderungen der myeloischen Populationen der Leber .....	94
7. Literatur .....	96
7.1 Zeitschriftenartikel.....	96
7.2 Monographien.....	109
7.3 Beitragswerke .....	109
8. Danksagung.....	110
9. Appendix .....	112

## **Abbildungsverzeichnis:**

Abbildung 1: Milzbranderreger in einer Makrophage einer Ratte, S. 9

Abbildung 2: Expertenkonsens über das MPS, S. 12

Abbildung 3: Skizze eines Lebersinus, S. 17

Abbildung 4: Darstellung der Splenomegalie der Versuchstiere, S. 32

Abbildung 5: Histologische Darstellung H&E-gefärbter Paraffinschnitte zur Dosisfindung, S.33

Abbildung 6: Bestimmung des Lebendzellgehalts mit Propidiumiodid, S.39

Abbildung 7: Kanäle des Milteny MACSQuant Analysegerät, S. 42

Abbildung 8: Erläuterung des allgemeinen Pregatings, S.45

Abbildung 9: Expression von PDCA-1 im Leukozytenkompartiment, S. 47

Abbildung 10: ESAM-Expression im Kupfferzellkompartiment, S. 49

Abbildung 11: Unabhängigkeit der ESAM-Expression von der eingesetzten Protease, S. 51

Abbildung 12: Expression von PDCA-1 in anderen Organen, S. 53

Abbildung 13: Expression von ESAM in anderen Organen, S. 54

Abbildung 14: Gatingstrategie zur Expressionsanalyse, S. 56

Abbildung 15: Expression makrophagenassoziierter Moleküle auf den verschiedenen

myeloischen Populationen der Leber, S. 57

Abbildung 16: Expression endothelassoziierter Moleküle auf den verschiedenen myeloischen Populationen der Leber, S. 59

Abbildung 17: Expression von Aktivitätsmarkern auf den verschiedenen myeloischen Populationen der Leber, S. 60

Abbildung 18: Strahlensensibilität der verschiedenen Kupfferzellpopulationen, S.62

Abbildung 19: Ergebnisse der Knochenmarktransferstudien, S. 64

Abbildung 20: Trennung der Population durch MACS, Positivfraktion, S. 65

Abbildung 21: Trennung der Population durch MACS, Negativfraktion, S. 66

Abbildung 22: Durchflusszytometrische Charakterisierung einer Primärkultur, S. 68

Abbildung 23: Veränderung der Primärkultur durch Zusatz inflammatorischer Stimuli, S. 70

Abbildung 24: Charakterisierung der RAW-Zelllinie, S. 71

Abbildung 25: Unterschiede im Zytokinexpressionsverhalten, S. 72

Abbildung 26: Ermittlung einer Dosis hitzeinaktivierter P.acnes, S. 74

Abbildung 27: Bestimmung des Zeitraums für die P.acnes-Injektionsexperimente, S. 76

Abbildung 28: Veränderungen des myeloischen Kompartiments bei P.acnes-assoziiertes Hepatitis, S. 78

Abbildung 29: Einfluss einer Splenektomie auf die Veränderungen des myeloischen Kompartiments, S. 81

Abbildung 30: Veränderungen des myeloischen Kompartiments im Rahmen einer MCD-induzierten Hepatitis, S. 83

Abbildung 31: Abhängigkeit der Makrophagenzusammensetzung vom BATF3-Status, S.84

Abbildung 32: UV-Fluoreszenz der Schaumzellen im Rahmen der MCD-induzierten Hepatitis, S. 86

Abbildung 33: Flächenanalyse unter Zuhilfenahme der UV-Fluoreszenz, S. 87

# 1. Abkürzungen

CD – Cluster of Differentiation

Clec – C-type Lektin

DC - dendritische Zelle

ESAM – Endothelial cell selective adhesion molecule

FCS – Fetales Kälberserum

FSC – Forward Scatter, Vorwärtsstreulicht

IL – Interleukin

LSEC – Liver sinus endothelial cell

MCD – Methionin- und cholindefiziente Diät

MerTK – Mer protoonkogen Tyrosinkinase

NASH – Nicht alkoholbedingte Steatohepatitis

PI – Propidiumiodid

p.i. - post infectionem

SSC – Sideward Scatter, Seitwärtsstreulicht

TNF - Tumornekrosefaktor



## 2. Zusammenfassung

Die Leber stellt als zentrales Stoffwechselorgan, dem über die Pfortader nahezu das gesamte venöse Blut der unpaaren Bauchorgane zufließt, eine Art „Torwächter“ für potentielle Noxen, die über den enterischen Weg in den Körper der Wirbeltiere eindringen dar.

Diese permanent hohe Exposition gegenüber Toxinen und Pathogenen bedingt zwei zentrale Eigenschaften der Leber: Zum einen zeigen Hepatozyten und Zellen der Lebersinus konstant eine hohe Filter- und Abbauaktivität. Zum anderen herrscht in der Leber ein ausgeprägt tolerogenes Milieu, welches nur durch starke proinflammatorische Noxen gebrochen werden kann. Aus diesem Grund sind detaillierte Betrachtungen der immunologischen Akteure der Leber auf zellulärer Ebene nicht nur von grundlagenwissenschaftlichem, sondern auch von großem klinischen Interesse.

Gegenstand dieser Arbeit waren vor allem die Makrophagen der Leber, die in organoresidente Makrophagen, so genannte Kupferzellen, und knochenmarkabhängige Makrophagen und Monozyten unterschieden werden können. (Eckert et al. 2015). Mit PDCA-1 konnte in dieser Arbeit ein Oberflächenmolekül erstmals zur Charakterisierung von Kupferzellen eingesetzt werden, das zuvor vor allem aus der Forschung an pDCs bekannt war. Darüber hinaus konnten zwei Subpopulationen von Kupferschen Zellen identifiziert werden, die sich in ihrer Größe und der Expression zellulärer Adhäsionsmoleküle unterscheiden, allerdings allenfalls gering in ihrer Strahlensensibilität und ihrer embryonalen Herkunft.

Diese beiden Gruppen konnten aus technischen Gründen nicht für funktionelle Essays herangezogen werden, zeigen aber in in-vivo-Experimenten ein distinktes numerisches Verhalten während einer metabolisch-induzierten und einer bakteriellen Hepatitis.

Ferner konnten unter Zuhilfenahme der Durchflusszytometrie Einblicke in das frühe numerische Verhalten der myeloischen Populationen der Leber bei entzündlichen Läsionen gewonnen werden, die nahelegen, dass es sich beim in der Literatur behaupteten „Kupferzellverlust“ während entzündlicher Lebererkrankungen lediglich um ein relatives Phänomen handelt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit erweitern das Wissen um die numerische Verteilung und ontologische Zugehörigkeit myeloischer Zellen insbesondere in der Leber.

### 3. Einleitung und Fragestellung

#### 3.1 Systematik der Makrophagen

Das Feld der Makrophagenbiologie ist wie alle anderen immunologischen Forschungsgebiete von den technischen Neuerungen der zurückliegenden Jahrzehnte in besonderer Weise berührt worden. Insbesondere die Einführung genetisch veränderter Tiere, genannt seien hier vor allem genetische Knockout- und Reporter-mäuse, und die rasante Evolution der Durchflusszytometrie, die die Darstellung verschiedener Moleküle auf zellulärer Ebene ermöglichte, verhalfen dem Feld zu einer enormen Entwicklung. Umso spannender ist es zu sehen, dass weder die zentralen Fragen der Makrophagenbiologie, noch die diskutierten Antworten seit der Entdeckung dieser heterogenen Gruppe von Zellen eine große Veränderung erfahren haben.

Zum Verständnis der Diskussion um die embryonale Herkunft der Makrophagen und deren Vorläufern im Erwachsenen, ebenso wie zur besseren Einsicht in die Streitfrage um morphologische und funktionelle Klassifikationssysteme innerhalb der Gruppe der Makrophagen ist es daher sehr hilfreich, einen Blick in die Vergangenheit des Forschungsgebiets zu werfen und zentrale Konzepte der Makrophagenbiologie in ihrer historischen Entwicklung zu betrachten.

##### 3.1.1. Der Begriff der „Makrophage“

Ilija Metschnikoff, der Träger des Nobelpreises für Physiologie oder Medizin des Jahres 1908 (zusammen mit Paul Ehrlich), beschrieb in den 80er Jahren des 19. Jahrhunderts gemeinsam mit Carl Claus die Phagozyten als *„sämtliche Zellen (...), welche im stande sind, in ihr Inneres feste Nahrung aufzunehmen und nach Möglichkeit zu verdauen.“*<sup>1</sup>. Diese aus heutiger Sicht sicherlich seltsam anmutende Definition ist vor allen Dingen dem Umstand geschuldet, dass Metschnikoff als Zoologe vor allem der Frage nach dem Stellenwert intrazellulärer Verdauung im Darm einfacher Vielzeller nachging (Metschnikoff 1882). Er schrieb der Phagozytose bei den untersuchten Tieren – Gegenstand seiner Untersuchungen waren verschiedene Echinodermata, vor allem Seeigel und Seesterne der Nord- und Ostsee, vor allem eine trophische Funktion zu, erkannte aber zugleich, dass phänotypisch ähnliche Prozesse auch bei höheren Tieren auftreten.

---

<sup>1</sup> Zitiert nach: Metschnikoff I (1884) Untersuchungen über die mesodermalen Phagozyten einiger Wirbeltiere. Biologisches Zentralblatt bd. 3: 560

So geht auf Metschnikoff auch die Beschreibung einer weiteren, nicht immunologischen Funktion von Makrophagen zurück. In seiner Arbeit „Über die pathologische Bedeutung der intracellulären Verdauung“ gibt er an, dass die bei der „*Metamorphose einer Kaulquappe stattfindende Atrophie des Larvenschwanzes und der Kiemen (...)* vorzugsweise durch die amöboiden Mesodermzellen bedingt“<sup>2</sup> sei und stellt hier ein Beispiel für die Bedeutung der Makrophagen in der Entwicklung des adulten Organismus vor. Neben diesen beiden zentralen Funktionen der Aufnahme lichtmikroskopisch

sichtbarer Partikel und deren konsekutiven intrazellulären Abbau in spezialisierten Zellen, von denen insbesondere die letztere, embryologisch relevante, auch anderen Tieren, wie Mäusen und Menschen beobachtet werden kann (Becic et al. 2016, Simkin et al. 2017), geht auf Metschnikoff auch die Erstbeschreibung der Aufgabe der Fresszellen zurück, die sie bis heute in den Fokus auch der medizinischen Wissenschaft rückt: Ausgehend von der Möglichkeit einzelliger Lebewesen, sich parasitärer Spezies durch Phagozytose und

konsekutive Degradation derselben zu erwehren, gelang es ihm, unter anderem am Beispiel des Milzbrands, herauszuarbeiten, dass eben dieselben Mechanismen auch in Körpern höherer Lebewesen dazu dienen könnten, krankheitserregende Mikroorganismen zu eradizieren. Diesen Beitrag zur Immunität der Lebewesen gegen Pathogene schrieb er allerdings lediglich den Leukozyten des Blutes zu, die er in Makrophagen und Microphagen unterschied.

So gut die Beobachtungen Metschnikoffs die physiologischen Beiträge zur Immunität, die von großen, phagozytierenden Zellen ausgehen umrissen, so sehr musste er in Ermangelung experimenteller Möglichkeiten das zellulare Wesen und den embryonalen Ursprung der die Immunität vermittelnden Zellen unerkannt lassen. Auch mussten ihm,

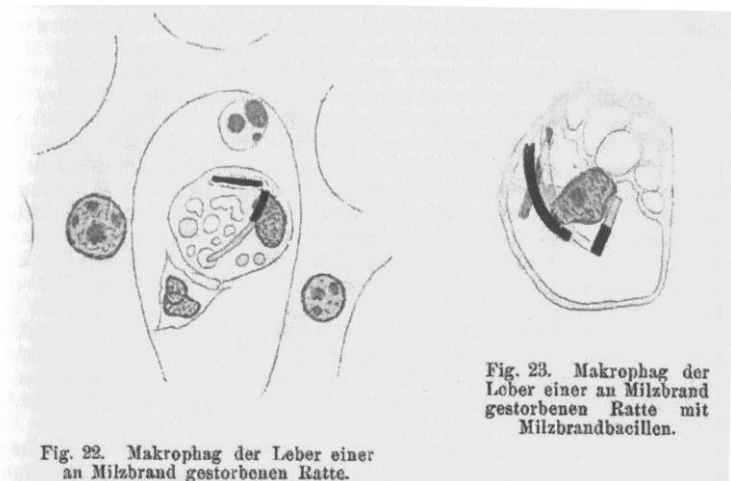


Abbildung 1: Metschnikoffs Zeichnung von Milzbranderregeren innerhalb von Makrophagen in der Leber einer Ratte (aus Metschnikoff 2015)

<sup>2</sup> Zitiert nach: Metschnikoff I (1884) Über die pathologische Bedeutung der intracellulären Verdauung. Fortschritte der Medizin No. 17. 3

aufgrund der wenig entwickelten Methoden der noch in ihren Anfängen begriffenen Molekularen Biowissenschaften, detailliertere Einsichten in die Mechanismen der Immunantwort verborgen bleiben. So beschreibt er die Granula, der von ihm „Microphagen“ genannten Granulozyten als „runde Körner“, die von „Vibrionen (angenommen werden) sobald sie einmal von den Leukocyten aufgezehrt worden sind“<sup>3</sup>. Seine Arbeiten sind geprägt von dem Versuch, möglichst viele verschiedene Zelltypen in das Modell der zellvermittelten Abwehr von Krankheitserregern durch Phagozytose einzuarbeiten. Gleichzeitig zeigen sie das Bemühen, möglichst viele distinkte Zelltypen als phagozytierende Leukozyten des Blutes zu identifizieren (Metschnikoff 2015). Diese zunächst vereinfachende Gruppierung immunologisch aktiver Zellen und die Reduzierung immunologischer Aktivität auf die Phagozytose konnte so bis heute nicht gehalten werden, sollte aber für einige Jahrzehnte die immunologische Diskussion über zelluläre Abwehrmechanismen prägen. Auch die Frage nach der embryonalen Herkunft der Macrophagen wird von den Autoren des späten 19. und frühen 20. Jahrhunderts nur marginal behandelt. Metschnikoff verweist lediglich darauf, dass phagozytierende Zellen vor allem „[dem] Mesoblast“ entstammen“<sup>4</sup>.

### 3.1.2. Das retikuloendotheliale System

Neben den von Metschnikoff beschriebenen Makro- und Mikrophagen, konnte eine bunte Vielzahl von phagozytierenden Zellen mit zumindest vermuteter immunologischer Funktion von den Forschern seiner Zeit beschrieben werden, deren Benennung allerdings keiner einheitlichen Nomenklatur folgte, sodass die hierarchischen Verhältnisse der einzelnen Zellen ebenso unklar bleiben mussten, wie die embryologische Herkunft derselben. Folgendes Zitat aus Kyonos Besprechung der Intravitalfärbung illustriert das wilde Nebeneinander verschiedener Zelltypen sehr anschaulich:

*„Zu den histiogenen Makrophagen gehören Ranviers Klasmatozyten, Maximows ruhende Wanderzellen, Marchands Adventitiazellen, welche einen Bestandteil des normalen Bindegewebes bilden und mehr oder weniger von den Fibroblasten abweichen.“<sup>5</sup>*

Obwohl den Forschern der Zeit die morphologische und funktionelle Ähnlichkeit unter anderem der oben genannten Zellen bewusst war, sollte es bis zum Jahr 1924 dauern, bis dem deutschen Pathologen Ludwig Aschoff ein längerfristig haltbarer Versuch einer

---

<sup>3</sup> Zitiert nach: Metschnikoff I (2015) Immunität bei Infektionskrankheiten. Vero Verlag, Norderstedt, S.132

<sup>4</sup> Zitiert nach: Metschnikoff I (2015) Immunität bei Infektionskrankheiten. Vero Verlag, Norderstedt, S.60

<sup>5</sup> Zitiert nach: Kyono K (1914) Die vitale Karminfärbung. Gustav Fischer Verlag. Jena, S. 220

einheitlichen Systematik der phagozytisch aktiven Zellen gelang. Aschoff prägte den Begriff des „retikuloendothelialen Systems“ in dem er sieben Zellgruppen eröffnete, die sich morphologisch und in ihrer Affinität zu in der Intravitalfärbung eingesetzten Pigmenten unterschiedlicher Korngröße unterschieden: Endothelzellen, Fibrozyten, Retikulumzellen von Milz und Lymphknoten (in der modernen Literatur fibroblastische Retikulumzellen), Histozyten, sowie Monozyten und „Splenozyten“, wie er die Makrophagen der roten Milzpulpa nennt. Aus seinem Begriff „retikuloendotheliales System“ schließt Aschoff die Endothelzellen und Fibrozyten aus, da diese sich *„sehr schwach färben und [...] sich auch [...] funktionell anders verhalten als die übrigen Gruppen“*.<sup>6</sup> Im verbliebenen System werden nur Zellen klassifiziert, denen ein Beitrag bei der Beseitigung von Fremdkörpern beigemessen werden kann (die verwendeten Farbstoffe wie zum Beispiel Karminrot werden nicht durch Pinozytose aufgenommen) während in der Metschnikoffschen Einteilung mit „Makrophagen“ auch Zellen bezeichnet werden, die bei der Aufnahme von Zelltrümmern beobachtet werden konnten.

Anders als in späteren Einteilungen ist in dieser Systematik die Abstammung von hämatopoietischen Zellen aber kein notwendiges Kriterium für die Zugehörigkeit zur Familie der Makrophagen, obwohl schon in diesen frühen Schriften, inspiriert durch morphologische Ähnlichkeit und die Beobachtung von Leukozytenextravasation im Lichtmikroskop der Verdacht der hämatopoietischen Abstammung der Gewebsmakrophagen geäußert wurde.<sup>7</sup>

### 3.1.3. Das mononukleäre Phagozytensystem

Während das Hauptaugenmerk der Aschoffschen Einteilung primär auf funktionellen Gesichtspunkten liegt (das primäre Klassenmerkmal ist die phagozytische Aktivität der einzelnen Zellgruppen), liegt der Schwerpunkt der von einem internationalen Expertengremium 1970 eingeführten Klassifikation (vgl. Langevoort et al 1970) auf der Abstammung der Zellen von gemeinsamen Vorläufern. Die Autoren zählen nur die Zellen zu einem gemeinsamen System, die von Monozytenvorläufern im Knochenmark abstammen und sich über die im Blut zu findenden Monozyten zu Makrophagen differenzieren. Auf diese Weise wurden Endothelzellen ebenso aus dem System der

---

<sup>6</sup> Zitiert nach: Aschoff L (1924) Das reticulo-endotheliale System. Ergebnisse der inneren Medizin und der Kinderheilkunde 26: 2-121 S.38

<sup>7</sup> Vergleiche: Aschoff L(1924) Das retikuloendotheliale System. Ergebnisse der inneren Medizin und Kinderheilkunde 26: 2-121 Kapitel II.1. Seite 26

Fresszellen ausgeschlossen, wie die von Aschoff noch eingeschlossenen „Reticulumzellen“ von Milz und Lymphknoten und die „Fibrozyten“, die wohl eher mit den heute als ortsständige Makrophagen beschriebenen Zellen übereinstimmen als mit Fibrozyten im modernen Wortsinn.

Eingeschlossen wurden allerdings nahezu alle anderen bereits von Aschoff betrachteten Zellen, insbesondere auch die später in dieser Arbeit ausführlich betrachteten Kupfferzellen der Leber. (vgl. van Furth 1972). Die Erkenntnisse, die zu dieser Gliederung führten, stammten vor allem aus Knochenmarktransferstudien, die mit bestrahlten Mäusen durchgeführt wurden. (Balner 1963, Virolainen 1968, Pinkett 1966).

Die aus heutiger Sicht größte Stärke des mononukleären Phagozytensystems ist die Erweiterung des konventionellen Verständnisses eines Zellsystems als Gruppe morphologisch und funktionell ähnlicher Zellen um die Dimension einer gemeinsamen Abstammung, die heute essentiell für immunologische und hämatologische Klassifikationssysteme auch jenseits der Makrophagen ist.

Dennoch konnte inzwischen, vor allem durch den Einsatz genetisch veränderter Mäuselinien, gezeigt werden, dass insbesondere bei den organoresidenten Makrophagen, wie Kupfferzellen oder der Mikroglia des Gehirns, der unidirektionale Ansatz, nach dem alle Makrophagen über die Monozyten von knochenmarkständigen Vorläuferzellen abstammen zu stark vereinfachend ist, da der Influx in ein bestimmtes zelluläres Kompartiment auch von inflammatorischen Stimuli abhängig ist. Das Vorliegen eben dieser Faktoren ist stark anfällig für Konfundierungen durch Unterschiede im Experimentaufbau, sodass hier eine Erklärung für die Unterschiede in den Beobachtungen bei den Transplantationsexperimenten der 60er Jahre des 20. Jahrhunderts und den genetischen Modellen des frühen 21. Jahrhunderts liegen mag.

Cells	Localization
PRECURSOR CELLS	bone marrow
↓	
PROMONOCYTES	bone marrow
↓	
MONOCYTES	bone marrow, blood
↓	
MACROPHAGES	connective tissue (histiocytes) liver (Kupffer cells) lung (alveolar macrophages) spleen (free and fixed macrophages) lymph node (free and fixed macrophages) bone marrow (macrophages) serous cavity (pleural and peritoneal macrophages) bone tissue (osteoclasts?) nervous system (microglial cells?)

Abbildung 2: Gliederung des mononukleären Phagozytensystems entsprechend dem Expertenkonsensus von 1972

(Abb. nach van Furth et al. 1972)

### 3.1.4. Ein modernes System der Macrophagen

Die augenscheinliche Evidenz und große Einfachheit des mononukleären Phagozytensystems führte dazu, dass es weltweit Verbreitung fand und vielen Forschern eine Grundlage zur weiteren Hypothesenbildung lieferte. Erst die Anwendung neuer bildgebender, molekularbiologischer und durchflusszytometrischer Ansätze lieferte neue Erkenntnisse, die die Vorstellung vom monolinearen Weg von der Stammzelle über den Monozyten zur Makrophage ins Wanken brachte. Zum einen erscheinen primitive Makrophagen in der Embryonalentwicklung vor den ersten reifen Monozyten (Takahashi et al. 1989), zum anderen zeigen monozytopen Tiere normale Zahlen an gewebsresidenten Peritonealmakrophagen (Kuziel et al. 1997).

Schon in den letzten Jahren des vergangenen Jahrhunderts fanden sich Hinweise darauf, dass organresidente Makrophagen, hier im speziellen Kupffersche Zellen, von „myeloischen“ Vorläufern der Dottersackhämatopoese abstammen (Naito et al. 1997).

Der Einsatz genetisch alterierter Mäuse zeigte zunächst für die Mikroglia des Gehirns, dass zumindest weite Teile dieser Population von frühen myeloischen Vorläufern der Dottersackhämatopoese abstammen, sich selbst erneuern können und damit nicht direkt von Blutmonozyten abstammen müssen (Ajami et al. 2007, Ginhoux et al. 2010). Der Einsatz von S100a4- und Mx-1-Reporterermäusen, zwei Moleküle, die zur Differenzierung von Monozyten beitragen, zeigte insbesondere für Mikroglia und Alveolarmakrophagen einen geringen Beitrag von Blutmonozyten zur Gesamtpopulation im adulten Tier (Hashimoto et al. 2013). Auch der Einsatz von CX<sub>3</sub>CR1-Reporterermäusen lieferte vergleichbare Ergebnisse, fügte der Reihe der früh in der Embryonalentwicklung angelegten Makrophagenpopulationen noch die Makrophagen der Niere, der Leber (Kupffersche Zellen), der Haut (Langerhanssche Zellen) sowie zwei Arten Peritonealmakrophagen hinzu. (Yona et al. 2013). Weitere Studien mit verschiedenen Reporter genen (Schulz 2012, Gomez Perdiguero 2015, Hoeffel 2015) bestätigen einen lediglich geringen Anteil von monozytärem Influx an diesen Populationen im adulten Tier und weisen auf die Abstammung der gewebsresidenten Macrophagen von embryonalen Monozyten hin. Einige Makrophagenpopulationen des Darms und der Bauchspeicheldrüse (Calderon et al. 2015) scheinen allerdings auch im ruhenden Zustand, das heißt in der Abwesenheit entzündlicher Prozesse von permanentem Einstrom aus dem Monozytenkompartiment abzuhängen (Bain et al. 2014).

Neben der Entdeckung des gleichzeitigen Vorkommens selbsterhaltender Makrophagenpopulationen, die bereits in der frühen Blutbildung im Dottersack entstehen und sich auch im ausdifferenzierten Status (Sieweke et al. 2013) selbst erhalten können und residenten Makrophagen, die permanenten Influx aus dem Monozytenkompartiment des adulten Blutstroms benötigen, um erhalten zu bleiben, führte auch die Entwicklung anderer Gebiete der Immunologie zur Notwendigkeit einer modernen Systematik der Makrophagen.

Seit der Entdeckung der dendritischen Zelle (DC) durch Ralph Steinman (Steinman et al. 1973) hat sich gezeigt, dass auch diese morphologisch definierte Gruppe bei genauerer Betrachtung insbesondere der Proteinexpression in verschiedenen Geweben und Milieus aus einer Vielzahl von teils gewebsspezifischen Subgruppen zusammengesetzt ist (O'Keeffe et al. 2015), die sich nicht immer deutlich von Makrophagen unterscheiden lassen, sondern ihnen phänotypisch sehr ähnlich sind. (Hume 2008, Rivollier et al. 2012).

Die noch zu Beginn des 21. Jahrhunderts verwendete Klassifikation der Makrophagen wurde aus den zuvor geschilderten Gründen 2014 durch einen Vorschlag einer internationalen Forschergruppe abgelöst, die zum ersten Mal die ontogenetische Abstammung einer Zelle und die bei der Differenzierung aktiven Regulatorgene der Bestimmung der Zugehörigkeit zu einer definierten Gruppe zu Grunde legen. (Guillams et al. 2014)

Die Autoren schlagen neben einer einheitlichen Systematik auch eine neue Nomenklatur der Zelltypen vor, die aus zwei hierarchischen Ebenen besteht: Nach einer initialen Zuordnung der Zelle als entweder in der Embryonalperiode oder während der adulten Phase ausdifferenziert, wird weiter unterschieden, ob die Zelle monozytären Ursprungs ist oder vom gemeinsamen DC-Vorläufer abstammt. In einem zweiten Schritt sollen dann zur näheren Beschreibung Präfixe eingesetzt werden, die auf die Lokalisation und charakteristische phänotypische Merkmale hinweisen. Für die Makrophagen gilt, dass sie in zwei Gruppen aufgeteilt werden können: Makrophagen mit Ursprung in der Embryonalzeit und von Monozyten abstammende Makrophagen, die erst im adulten Tier ausreifen. Die Einteilung und Nomenklatur ermöglicht eine präzisere Differenzierung beobachteter Populationen und gibt den im Wissenschaftsfeld aktiven Forschern eine vereinfachende Nomenklatur an die Hand, ein großer Fortschritt hinsichtlich der breiten Vielfalt an in der Literatur verwendeten Bezeichnungen, durch die eine Vergleichbarkeit experimenteller Ergebnisse nicht gewährleistet ist. Die größte Schwäche des Systems ist die schwierige Anwendbarkeit in der praktischen Anwendung: Abstammungsstudien in der



Maus sind lediglich mit genetisch veränderten Organismen oder Transferstudien möglich, was nicht nur eine starke Alteration des Mauswildtyps darstellt, sondern außerdem mit einem großen experimentellen Aufwand einhergeht. Die Darstellung von Oberflächenantigenen mittels Immunhistochemie oder Immunfluoreszenz, wie sie zum Beispiel bei FACS-Analysen zur Anwendung kommt, ermöglicht nicht per se eine Analyse der Abstammung von Zellen, was mutmaßlich einen der zentralen Gründe darstellt, weswegen die vorgestellte Systematik nur schleppend Einzug in die breite Literatur findet. Kupffersche Zellen werden von der Mehrheit der Autoren derzeit der Gruppe der Makrophagen mit Differenzierung in der Embryonalzeit zugeordnet (Yona et al. 2013). Hat diese Einordnung im gesunden Tier ihre Berechtigung, so zeigen andere Studien an Tieren, bei denen eine Hepatitis induziert wurde (Blériot et al. 2015), dass unter diesen Bedingungen der Influx aus dem monozytären Kompartiment wahrnehmbar werden kann. Darüber hinaus steht diese Vermutung im scheinbaren Widerspruch zu älteren Beobachtungen, die einen Ersatz der Kupfferschen Zellen im Rahmen von Knochenmarktransferstudien nahelegen (Balner 1963).

### **3.2. Organresidente Makrophagen: Allgemeine Merkmale**

Beschreibungen von Zellen mit morphologischen und funktionellen Makrophagen-eigenschaften, die sich fest in den Organen der Tiere und des Menschen finden, sind bereits älter als der Begriff der „Makrophage“. Die Benennung derselben richtet sich daher meist nach dem Erstbeschreiber oder der Lokalisation und folgt nicht immer einer Systematik. Neben den Kupfferschen Zellen als organresidente Makrophagen der Leber seien hier zur Verdeutlichung der bunten Benennungstradition noch Hofbauersche Zellen der Plazenta, Langerhanssche Zellen der Haut, die Microglia des Gehirns als Hortegasche Zellen und die Alveolarmacrophagen der Lunge genannt. Diese Zellen wandern, wie zuvor dargestellt (vgl. Kapitel 3.1.4.), in der Majorität während der embryonalen Blutbildung in ihr Zielorgan ein und differenzieren unter dem Einfluss lokaler Signale zum adulten Phänotyp aus (Okabe et al. 2014). Diesen Zellen werden allgemeine Funktionen zugeschrieben, die die verschiedenen organspezifischen Teilpopulationen dieser Gruppe miteinander teilen, wie die Degradation apoptotischer Zellen mit gleichzeitiger Sekretion antiinflammatorischer Zytokine (Fadok et al. 1998), die Erhaltung von Stammzellnischen (Gyorki et al. 2009, Chow et al. 2011) und die Organisation des Gewebstromas, insbesondere der Vaskulogenese und Lymphangiogenese der Organe (Stefater et al. 2011, Gordon et al.

2010). Andere Aufgaben sind hochspezifisch für einzelne Makrophagenpopulationen, wie die Mitwirkung der Osteoklasten am Knochenumsatz oder die Phagozytose defekter Erythrozyten durch die Makrophagen der roten Pulpa der Milz (Kurotaki et al. 2015).

Auch phänotypisch teilen sich organresidente Makrophagen einige Eigenschaften. Sie zeigen große, im Lichtmikroskop plump anmutende Zellleiber mit geringer Kern/Plasmarelation und finden sich meist in Bezug zu Epithelien oder Endothelien. Außerdem exprimieren sie auf ihrer Oberfläche bestimmte gemeinsame Membranproteine. Das Protein F4/80, ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, ist ein wichtiges Beispiel für ein als Marker eingesetztes Transmembranprotein. Seine exakte Funktion ist bis heute unklar, Knockoutmäuse zeigen aber eine eingeschränkte Selbsttoleranz (Lin et al. 2005). Es wird im gesunden, adulten Tier auf der Oberfläche nahezu aller Gewebsmakrophagen, mit Ausnahme von Osteoklasten und Marginalzonenmakrophagen der Milz exprimiert (Gordon et al. 2011). Gleichzeitig ist es im ruhenden, d.h. nicht kranken, Zustand nicht auf Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten exprimiert, was es in der Differenzierung dieser Zelllinien zu einem wertvollen Werkzeug macht. Allerdings exprimieren neben den organresidenten Makrophagen auch eosinophile Granulozyten F4/80 (McGarry et al. 1991). In nicht entzündlich veränderten Geweben machen diese aber lediglich einen sehr geringen Anteil an der Gesamtzellzahl aus und werden daher meist vernachlässigt.

Genetische Studien des ImmGen-Konsortiums zeigten als weitere phänotypische Gemeinsamkeit der organresidenten Makrophagen die Expression der Tyrosinkinase MerTK (Gautier et al. 2012). Diese trägt in Makrophagen zur Phagozytose apoptotischer Zellen und der damit verbundenen Aufrechterhaltung eines antiinflammatorischen Milieus bei (Lemke et al. 2008).

Die genannten genetischen Analysen förderten außerdem zu Tage, dass trotz augenscheinlicher funktioneller und morphologischer Gemeinsamkeiten nur sehr wenige transkriptionelle Marker zwischen den als Gewebsmakrophagen klassifizierten Zellen übereinstimmen, und es zwischen den einzelnen Vertretern große Unterschiede auf transkriptioneller Ebene gibt (Gautier et al. 2012). Diese werden durch gewebsspezifische Differenzierungssignale erklärt, denen die Makrophagen im jeweiligen Organ unterworfen sind (Lavin et al. 2014).

Auf diese Weise erwerben Makrophagen bereits früh im Verlauf der Embryonalentwicklung, unmittelbar nach Besiedlung der jeweiligen Umgebung ein transkriptionelles Schlüsselprofil, das sie als spezifische Makrophagenpopulation kennzeichnet (Mass et al. 2016).

### 3.2.1 Kupffersche Zellen

Die in der Leber vertretenen Gewebsmakrophagen wurden 1876 von Carl Kupffer in einem Brief an den Anatomen Waldeyer (Kupffer 1876) als regelmäßig in Leberläppchen verteilte Zellpopulation, deren Darstellung ihm auf der Suche nach Nervenstrukturen in der Leber gelang, erstbeschrieben. Ebenfalls auf Kupffer geht die Entdeckung zurück, dass es sich bei den gefundenen Zellen nicht um

Neurone handelt, sondern diese sowohl injizierte Tusche als auch Schaferthrombozyten in sich aufnehmen und degradieren (Kupffer 1899). Der Erstbeschreiber der später nach ihm benannten Zellen unterschied aber noch nicht zwischen den Kupfferschen Zellen im heutigen Sinne, den ortsständigen Makrophagen der Leber und den hepatischen Sternzellen, die diesen zwar morphologisch sehr ähnlich sind, aber in erster Linie der Vitaminspeicherung und als mesenchymale Vorläuferzellen dienen (Kordes et al. 2015), weswegen für

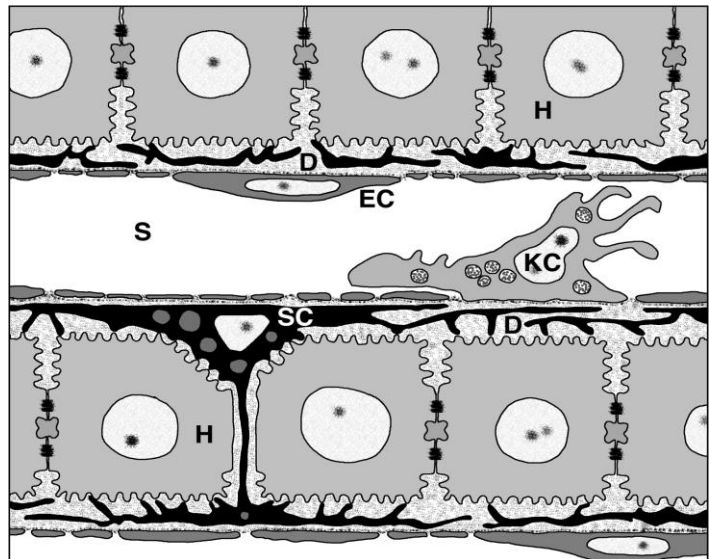


Abbildung 3: Skizze des Lebersinus (S)

Dargestellt ist die intraluminal Lage der Kupfferschen Zellen (KC). Diese Position unterscheidet sie von anderen Zellen der Sinus (S), wie den fenestrierten Endothelzellen (EC) oder der den im Disseschen Raum (D) lokalisierten Sternzellen (SC). Aus Frevert et al. 2005

letztere noch heute der irreführende

und inhaltlich falsche Name „Kupffersche Sternzellen“ in der Literatur zu finden ist.

Kupffersche Zellen stellen die größte gewebsresidente Makrophagenpopulation des Wirbeltierkörpers dar (Singer et al. 1969). Sie sind typischerweise in den Lumina der Sinus der Leber lokalisiert (Abb. 3), wo sie das aus der Pfortader und der Arteria hepatica communis stammende Blut als „Torwächter“ filtern, bevor aus dem Darm aufgenommene Substanzen den systemischen Kreislauf erreichen. Hierbei zeigen sie eine immense Phagozytosekapazität, auch für primär systemisch (nicht primär portal) zirkulierende Partikel. (Willekens et al. 2005, Heymann et al. 2015). Ihnen ist im ruhenden Zustand eine lange Lebenszeit von ca. 14 Monaten in der Ratte zu eigen, womit sie ihre geringe proliferative Aktivität kompensieren (Bouwens et al. 1986). So sind lediglich 1,5% der Kupffer-Zellen der Ratte im nicht stimulierten Zustand in Mitose (Crofton et al. 1978).

Die geringe Proliferationsrate trägt sicherlich zur Strahlenfestigkeit bei, die sie von monozytären Makrophagen, die auch neben ihnen in der Leber anzutreffen sind, unterscheidet (Klein et al. 2007).

In den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts zeigten elektronenmikroskopische Studien, dass sich die Kupfferschen Zellen der Rattenleber in eine große und eine kleine Population aufteilen lassen (Hardonk et al. 1989). Während die großen Makrophagen eher periportal anzutreffen sind und bei der intravenösen Applikation von Latexpartikeln eine hohe Phagozytoserate zeigen, sind die kleineren Kupfferschen Zellen eher zentrilobulär anzutreffen, wo sie geringe Phagozytoseraten zeigen. (Hardonk et al. 1989, Bouwens et al. 1986). Ob es sich bei kleinen und großen Lebermakrophagen um distinkte Populationen, etwa monozytäre und embryonale Makrophagen handelt, oder hier verschiedene Differenzierungen Kupfferscher Zellen dargestellt wurden, war mit den Methoden der Zeit nicht zu klären.

Allerdings zeigen auch neuere Aufsätze die Existenz verschiedener Subentitäten der Kupfferschen Zellen. *Kinoshita et al.* konnten zeigen, dass die F4/80 exprimierenden Zellen der Leber entweder CD11b oder CD68 exprimierten und diese verschiedene Oberflächenmarkerexpression auch verschiedenen funktionellen Differenzierungen in Bezug auf Phagozytoserate und Cytokinproduktion entspricht. (Kinoshita et al. 2010).

Auch wenn sich diese Einteilung in nachfolgenden Publikationen nur bedingt reproduzieren ließ hat die Publikation dazu beigetragen, die Idee der Kupfferzellheterogenität wieder in die Gegenwart zu befördern.

### **3.3. Funktionelle Aspekte der Makrophagenheterogenität**

Neben der Heterogenität von Makrophagen in Bezug auf Ontogenese, Lokalisation und Morphologie, können auch verschiedene funktionelle Subgruppen unterschieden werden (Italiani et al. 2014).

In Analogie zu den verschiedenen Differenzierungen von CD4-T-Zellen findet sich in der Literatur häufig eine Einteilung in M1- und M2-Makrophagen. Während erstere durch Interferon gamma aktiviert werden, in gesteigertem Maße Antigene via MHC I und II-Moleküle präsentieren und T<sub>h</sub>1-assoziierte Cytokine wie Interleukin 12 oder Interleukin 23 synthetisieren, werden letztere vor allem durch Interleukin 4 und Interleukin 13, klassische T<sub>h</sub>2-assoziierte Cytokine, aktiviert. Auch die Präsenz von Interleukin 10 oder Glucocorticoiden zusammen mit bakteriellen Abbauprodukten führt zu Ausbildung eines so

genannten M2-Phänotyps (Italiani et al. 2014).

Dieser wird charakterisiert durch schwache Sekretion von proinflammatorischen Cytokinen wie TNF, Interleukin 1 oder Interleukin 6 bei starker Expression von antiinflammatorischen Signalmolekülen wie Interleukin 10 (Mantovani et al. 2004). Auf durchflusszytometrischer Ebene werden die Oberflächenmoleküle CD 206 (das auch von LSECs exprimiert wird) und YM-1 mit M2-Macrophagen assoziiert, wohingegen die Expression des Transkriptionsfaktors IRF-5 mit dem Vorliegen eines M1-Phänotyps in Verbindung gebracht wird. Die große Einfachheit und die Analogie zu den Subgruppen der T-Lymphozyten führte zu einer weiten Verbreitung dieser funktionellen Systematik und damit auch zu einer sehr starken Vereinfachung des breiten Spektrums an Macrophagensubtypen (Martinez et al. 2014).

Da Macrophagen bereits im ruhenden Zustand eine hohe phagozytische Aktivität zeigen und auf Aktivierung mit der Freisetzung einer Plethora von Molekülen reagieren (Crofton et al. 1978, Dugue et al. 2014, Murray et al. 2014) ist eine bipolare Darstellung nicht mit der gleichen Trennschärfe umzusetzen, wie sie bei Helfer-T-Zellen anwendbar ist.

Unter anderem im Rahmen von Untersuchungen der Auflösung fibrotischer Veränderungen der Mäuseleber, konnten Betrachtungen des Transkriptoms der beteiligten Makrophagen zeigen, dass durchaus Phänotypen beobachtet werden können, die Eigenschaften beider Differenzierungen zeigt (Ramachandran et al. 2012). Es erscheint auf den ersten Blick einleuchtend, dass die Vielzahl von Makrophagenfunktionen nur sehr schwer auf die Expression weniger einzelner Moleküle reduziert werden kann. Daneben ist stark zu bezweifeln, dass die Annahme eines bestimmten Phänotyps eine zeitlich stabile Eigenschaft von Makrophagen darstellt. Bei diesen handelt es sich um eine sehr plastische Zellgruppe, die innerhalb weniger Zeit auf gewebsspezifische Signale reagieren kann (Okabe et al. 2014).

Aus diesen Gründen sollte die starre Einteilung in M1- und M2-Makrophagen nicht mehr ohne eine entsprechende kritische Einordnung stattfinden und findet in dieser Arbeit keine Anwendung.

### **3.4. Rolle und Herkunft der Macrophagen bei entzündlichen Lebererkrankungen**

#### **3.4.1. Akute Entzündungen der Leber**

Im ruhenden Zustand, also in Abwesenheit entzündlicher Reize, stellen Kupfferzellen nicht nur die größte Makrophagenpopulation des menschlichen Körpers (Singer et al. 1969), sie stellen auch innerhalb der Leber die größte Leukozytenpopulation. (Blériot et al. 2015, eigene Beobachtung). Diese Verteilung verändert sich innerhalb der ersten Stunden nach Einwirken eines entzündungsverursachenden Reizes.

Akute Entzündungen der Leber werden als Reaktion auf verschiedene äußere Noxen und endogene Zustände beobachtet. Neben Infektionen durch Viren, Bakterien, Protozoen und tierische Parasiten können auch erworbene und hereditäre metabolische Zustände eine akute Hepatitis auslösen. Auch bei verschiedenen primär entzündlichen Erkrankungen kann eine ausschließliche oder begleitende Leberbeteiligung beobachtet werden. Als Beispiel für die erste Gruppe sollen hier die primär billäre Cholangitis, und die primär sklerosierende Cholangitis genannt sein, die zweite Gruppe wird beispielsweise durch die Sarkoidose repräsentiert.

Die vielfältige Ätiologie der akuten Hepatitis spiegelt sich in einem bunten Bild der Reaktionsmuster wieder, die in histopathologischen Präparaten ebenso beobachtet werden können, wie in laborchemischen Analysen. (vgl. Brunt et al 2014)

Insbesondere bei akuten bakteriellen und helminthischen Infektionen spielt die Infiltration der Leber mit Granulozyten und Monozyten eine große Rolle. Aber auch die sterile Entzündung der Leber durch Hitzekoagulation eines Teils der Leber oder Acetaminophenintoxikation simuliert, ist durch eine rapide Extravasation von neutrophilen Granulozyten<sup>8</sup> (Margues et al. 2012, McDonald et al. 2011) und Monozyten, sowie monozytenabhängiger Makrophagen (Mosannen et al. 2016) gekennzeichnet. Unabhängig von der auslösenden Noxe gehen akute Leberentzündungen mit einer erhöhten auch unspezifischen Filtrationsrate des Pfortaderbluts in der Leber einher, was sich unter anderem an einem erhöhten Albuminumsatz zeigt (Kitani et al. 1972). Interessanterweise scheint diese frühe Phase der Entzündungsreaktion auf durchflusszytometrischer Ebene

---

<sup>8</sup> McDonald et al. (2011) zeigen, dass die Zahl der Neutrophilen Granulozyten durch Zufluss aus dem Blutstrom innerhalb von 4 h um den Faktor 10 anwächst. Bereits eine Stunde nach dem Zufügen der thermischen Läsion zeigt sich eine deutliche Zunahme der Neutrophilenzahl im Gewebe.

bei Entzündungen unterschiedlicher Ätiologie und Histopathologie ähnlich geartet zu sein. Makrophagen und Monozyten spielen in dieser frühen Phase der Entzündung eine wichtige Rolle, insbesondere bei der Propagation des entzündlichen Geschehens durch Sekretion proinflammatorischer Mediatoren (Krenkel et al. 2017, Qin et al. 2017). Verschiedene Autoren berichten zudem über eine Abnahme der Zahl der Kupfferschen Zellen in der frühen Phase der akuten Entzündung. (Blériot et al. 2015, Zigmond et al. 2014). Diese Beobachtungen basieren meist auf der Auswertung durchflusszytometrischer Daten, die zunächst relative Daten liefern. Eine massive Infiltration des Lebergewebes durch primär nicht leberständige Zellen muss also als Ursache für den, in diesem Fall lediglich relativen „Verlust“ von Kupfferzellen in jedem Fall mitberücksichtigt werden. Auch ein verändertes Expressionsprofil bei gleichbleibender Zahl an Kupfferzellen kann von keinem der Autoren ausgeschlossen werden. Aus der früheren, primär licht- und elektronenmikroskopisch basierten Literatur sind keine Angaben zum Verlust von Kupfferzellen zu entnehmen, wobei in den einschlägigen Beiträgen eine Differenzierung verschiedener Makrophagenpopulationen<sup>9</sup> nur schwer und sehr subjektiv möglich war.

Monozyten, die in den ersten Stunden bis Tagen das Leberparenchym infiltrieren, entstammen dem Knochenmark und sind abhängig vom Monocyte-chemoattractant Protein 1 (MCP-1, auch CCL 2), das an den C-C chemokine receptor 2 bindet (Karlmark et al. 2009). Eine genetische oder pharmakologische Inhibition dieses Signalwegs führt zu einer signifikanten Abnahme des Monozyteninfiltrats und zu deutlich reduzierten Schäden am Leberparenchym. (Karlmark et al. 2009, Baeck et al. 2012). Monozyten oder monozytenabhängige Zellen scheinen allerdings auch bei der Resolution entzündlicher Lebererkrankungen eine Rolle zu spielen. So führt eine aberrante Monozyteninvasion in die Leber in der Frühphase der Entzündung zu reduzierten Leberschäden, in späteren Phasen der Entzündung scheint eine reduzierte Monozyteninvasion allerdings zu einer verlangsamten Rückbildung entzündlicher Läsionen zu führen (Graubardt et al. 2017, Zigmond et al. 2014).

Kupfferzellen wird insbesondere bei der Initiation der Leberentzündung eine große Bedeutung beigemessen. (Heymann 2016 et al., Tacke et al. 2014) Als ortsständige Makrophagen machen verschiedene Autoren sie insbesondere für das Aufspüren von Gewebeschäden und die Freisetzung proinflammatorischer Chemokine verantwortlich, die die Migration von neutrophilen Granulozyten und Monozyten in der frühen

---

<sup>9</sup> Insbesondere die Abgrenzung von Kupfferzellen gegen monozytenabhängige Makrophagen ist bei der Zugrundelegung rein Zytomorphologischer Kriterien sehr schwierig.

Entzündungsphase regulieren und das primär tolerogene Milieu, das im ruhenden Zustand in der Leber herrscht, durchbrechen. (Krenkel et al. 2017, Heyman et al 2015). Allerdings gibt es derzeit weder eine detaillierte morphologische oder molekulare Beschreibung eines proinflammatorischen Phänotyps von Kupfferschen Zellen, noch gibt es aufschlussreiche funktionelle Daten aus dieser frühen Phase der Entzündung. Ferner ist die Initiationsphase der akuten Hepatitis noch nicht ausreichend detailliert beschrieben worden. Die meisten Autoren fokussieren ihre Arbeiten aus technischen Gründen auf den entzündlichen Zustand wenige Tage nach Einwirkung einer Noxe auf die Leber, sodass Beobachtungen der ersten Stunden des Entzündungsprozesses nicht vorliegen. Aus therapeutischer Sicht sind allerdings Erkenntnisse über frühe Phasen entzündlicher Lebererkrankungen unbedingt notwendig, da hier das Potential für therapeutische Targets für verschiedene Formen akuter, entzündlicher Lebererkrankungen verborgen liegt.



### 3.4.2. Chronische Entzündungen der Leber

Ähnlich der akuten Entzündung entstehen chronische Entzündungen der Leber als Reaktion auf eine Plethora von Noxen, die sich analog der akuten Entzündung in infektiöse, metabolische, primär entzündliche und toxische Ursachen klassifizieren lassen. (Reiser 2009). Als „gemeinsame Endstrecke“ all dieser langfristig andauernden entzündlichen Leberveränderungen steht die Leberzirrhose, der vollständige, beim Menschen irreversible, fibrotische Umbau des Leberparenchyms.

Versuche an Mäusen mit verschiedenen Modellen konnten zeigen, dass sowohl bei der Entstehung wie auch bei der Aufrechterhaltung und Resolution eines fibrotischen Umbaus Makrophagen verschiedener Subgruppen beteiligt sind. Dabei wirken zu verschiedenen Zeitpunkten an verschiedenen Orten verschiedene myeloische Populationen parallel oder miteinander um spatiotemporal hochorganisierte Destruktions- und Reparationsabläufe zu ermöglichen (Brempeis et al. 2016, Tacke et al. 2014, Krenkel et al. 2017).

In den Veröffentlichungen, die sich mit der Rolle von Makrophagen bei chronischen Entzündungen der Leber befassen, herrscht wie in der Literatur zu akuten Leberschäden eine deutliche Begriffsverwirrung in der korrekten Bezeichnung der betrachteten Population insbesondere in Hinblick auf Kupffersche Zellen sensu strictu und monozytenabhängige Makrophagen.

Nach der schnellen Infiltration der Leber durch inflammatorische Monozyten (s.o.) differenzieren sich diese zu monozytenabhängigen Makrophagen (Liasakou et al. 2013, Zimmermann et al. 2010, Ramachandran et al. 2012). Eine Depletion von Monozyten und/oder Makrophagen zu diesem frühen Zeitpunkt führt zu einem reduzierten Leberzelluntergang, was insbesondere auf einen destruktiven Einfluss der entzündlichen Zellen auf das Leberparenchym hindeutet (Duffield et al. 2005, Karlmark et al. 2009, Baeck et al. 2012). Eine Einordnung der knochenmarkabhängigen Makrophagen in das eingangs erwähnte M1/M2 Schema ist zu diesem Zeitpunkt, wie oben erwähnt, nicht mit hinreichender Trennschärfe möglich. Eine Depletion von Monozyten zu späteren Zeitpunkten einer chronischen Leberschädigung führt ebenso wie die Verhinderung der Invasion in die Leber oder eine Verhinderung der Freisetzung von Monozyten aus dem Knochenmark ins periphere Blut zu einer abgemilderten Rückbildung fibrotischer Umbauprozesse. (Duffield et al. 2005., Fallowfield et al. 2007). Auf molekularer Ebene existieren verschiedene Modelle zur Erklärung dieser scheinbar widersprüchlichen Rolle von monozytenabhängigen Zellen: Während manche Autoren von der gleichzeitigen

Präsenz verschiedener Aktivitätsmuster in den Makrophagen der profibrotischen Phase mit unterschiedlicher Lebensdauer ausgehen (Beljaars et al. 2014), vertreten andere die Ansicht einer Umdifferenzierung einer einheitlichen Population unter dem Einfluss lokaler Faktoren (Tacke et al. 2014). Eine Einordnung der pro- und antifibrotischen Makrophagensubtypen in das konventionelle M1/M2-Schema wurde von verschiedenen Autoren versucht (Sun et al. 2017, Dey et al. 2015), allerdings zeigen immunhistochemische (Beljaars et al. 2014) und molekulare Analysen der in der Resolutionsphase vorherrschenden Makrophagenpopulation, das Vorliegen eines nicht eindeutig im -ohnehin nicht unstrittigen- M1/M2-System verortbaren Phänotyps (Ramachandran et al. 2012).

Da verschiedene Modelle zur Makrophagendepletion nicht zwischen Zellen monozytären Ursprungs und originär leberresidenten Makrophagen unterscheiden<sup>10</sup>, lässt sich der differenzielle Einfluss der verschiedenen Populationen auf Progression und Regression der Fibrose meist nicht zweifelsfrei darstellen. Bei der Zuhilfenahme des Lokalisationskriteriums zur Differenzierung der Populationen -Kupffer-Zellen als Makrophagen der Lebersinus, monozytäre Makrophagen als Bestandteile des periportalen Entzündungsinfiltrats- erscheint eine Trennung dieser Gruppen zwar möglich, allerdings sind so weder durchflusszytometrische noch molekulare Analysen ohne weiteres durchführbar, noch findet die Migrationsfähigkeit von Kupfferzellen Berücksichtigung (Klein et al. 2007). Letztlich kann dieses Kriterium in der entzündeten Leber auch aufgrund der potentiell alterierten Histoarchitektur nicht ohne weiteres Anwendung finden.

---

<sup>10</sup> Sowohl Chlodronathaltige Liposomen als auch der CD 11b gekoppelte Diphtherietoxinrezeptor betreffen Monozyten wie Kupfferzellen in gleichem Maße.

### **3.5. Fragestellung der Arbeit**

Wie in den vorangehenden Kapiteln gezeigt, kommt Makrophagen der Leber eine große Rolle in der Pathogenese und Regeneration akuter und chronischer Leberkrankheiten zu. Detaillierte Kenntnisse der numerischen und anatomischen Verteilung der verschiedenen Subgruppen einerseits, aber auch Einblicke in ähnliche und verschiedene Funktionen der einzelnen ontogenetisch definierten Gruppen sind essentielle Grundlage für die Adressierung von Makrophagen als Targets kurativer und präventiver Maßnahmen bei verschiedenen Leberkrankheiten. Auch um Einblicke in die Kinetik der Zelldifferenzierung im Rahmen entzündlicher Lebererkrankungen zu gewinnen, ist eine präzise, reproduzierbare, und detaillierte Gliederung der Leukozyten der Leber vonnöten.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist es, die Kupfferzellen der murinen Leber auf das Vorliegen zweier distinkter Populationen zu untersuchen. Nach der eingehenden Prüfung der Charakteristika dieser Subgruppen in der gesunden Mäuseleber sollten Modelle entwickelt werden, die die phänotypisch verschiedenen Zellen auch für funktionelle Analysen zugänglich machen. In einem letzten Schritt sollen die numerischen und funktionellen Unterschiede der entsprechenden Zellgruppen in zwei distinkten Mausmodellen exploriert werden.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Puffer und Reagenzien

#### 4.1.1. Puffer und Lösungen

<b>Puffer/Substanz</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma	D8537
Hank's Balanced Salt Solution	Sigma	H8264
EDTA Stock 0.5 M pH 7,4	Sigma	E8008
<b>Durchflusszytometrie</b>		
MACSquant Running Buffer	Miltenyi biotech	130-092-747
AutoMACS Rinsing Buffer	Miltenyi biotech	130-091-222
AutoMACS Running Buffer	Miltenyi biotech	130-091-221
ACK Lysepuffer	Sigma	R7757
Fc-Receptor blocking solution	Miltenyi	130-059-901
<b>Zellkultur</b>		
RPMI Culture media	Life technology	R8758
Fetales Kälberserum	Life technology	11875-093
Collagen Ia	Life technology	A1048301
<b>Histologie</b>		
Paraformaldehyd	Morphisto GmbH	10303
BSA 0.27g in 9ml PBS	Sigma	A1933

Biotin blocking solution		
O.C.T. Compound	Tissue Tek	4583
Blockaid blocking solution	Thermo fisher scientific	B10710

Tabelle 1: Puffer und Lösungen

#### 4.1.2. Enzyme

Enzym	Konzentration der Stocklösung	Hersteller	Katalognummer
DNase I	50 mg/ml in 50% Glycerol, 1mM MgCl <sub>2</sub> , 20mM Tris-Buffer pH 7,5	Roche	10104159001
Collagenase P	100mg/ml in HBSS	Roche	11213857001
Collagenase D	100mg/ml in HBSS	Roche	11088858001
Dispase	100mg/ml in HBSS	Gibco	17105-041

Tabelle 2: Enzyme

#### 4.1.3. Antikörper

Antigen	Klon	Label	Stockkonz.	Verdünnung FACS	Verdünnung Histologie	Hersteller
---------	------	-------	------------	--------------------	--------------------------	------------

##### Leukozytenmarker

CD 11b	M1/70	PE/Cy7	0,2 mg/ml	1:1600		Biolegend
CD 11c	N418	PE/Cy7	0,2 mg/ml	1:400		Biolegend
CD 26	H194-112	PE, FITC	0,2 mg/ml	1:200		Biolegend
CD 45	30F11	APC/Cy7	0,2 mg/ml	1:400	1:200	Biolegend
CD 64	X57-5/7.1	Brilliant Violet	0,2 mg/ml	1:200		Biolegend

Ly6C	HK1.4	Vioblue	0,2mg/ml	1:10.000		Biolegend
Ly6C	AL-21	Vioblue	0,2mg/ml	1:10.000		Biolegend
Ly6G	1A8	FITC	0,2mg/ml	1:200		Biolegend
F4/80	BM8	PE, Alexa 488	0,5 mg/ml	1:400	1:200	Biolegend
PDCA-1	129C1	Alexa 647	0,5mg/ml	1:400		Biolegend
MerTK	REA477	APC	30µg/ml	1:20		Miltenyi
MHC-II	M5/114.15.2	Alexa 488	0,5mg/ml	1:1200		Biolegend
CD 68	F-11	Alexa 488	0,5mg/ml	1:200		Biolegend

### **Endotheliale Marker**

CD 31	MEC13.3	PE, FITC	0,2mg/ml	1:200		Biolegend
CD 146	ME-9F1	Biotin	30µg/ml	1:33		Miltenyi
ESAM	1G8/ESAM	PE, FITC	0,2 mg/ml	1:200		Biolegend

*Tabelle 3: Antikörper*

## **4.1.4. Selbst hergestellte Lösungen**

### 4.1.4.1. Zellkulturlösung

Zur Herstellung von Zellkulturlösung wurden 500 ml RPMI unter der Sterilbank mit 50 ml Fetalem Kälberserum und einer Penicillin/Streptomycinmischung vermischt. Anschließend wurde die Lösung bei 4°C gelagert.

### 4.1.4.2. Verdaupuffer

Zum enzymatischen Verdau von Organen wurde jeweils frisch ein Puffer angesetzt, indem zu 50 ml RPMI 0,5 ml Fetales Kälberserum gegeben wurden. In dieser Mischung wurden dann 300 µl Dispase, 100 µl Collagenase P und 100 µl DNase I (Ausgangskonzentrationen siehe Tab. 2) gelöst. Anschließend wurde der Puffer bis zur Verwendung auf Eis gelagert und unmittelbar vor dem Einsatz im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

### 4.1.4.3. Sammelpuffer

Ebenfalls beim enzymatischen Verdau kommt ein Sammelpuffer zum Einsatz, der vor jedem Verdau frisch aus 50 ml RPMI, 0,5 ml Fetalem Kälberserum und 200 µl EDTA

(Ausgangskonzentration: 0,5 M) angesetzt wird. Anschließend wird der Puffer auf Eis gelagert.

## **4.2. Tiermodelle**

### **4.2.1. Allgemeines**

Alle Tierexperimente wurden vor der Durchführung der verantwortlichen Stelle im Landesamt für Verbraucherschutz in Saarbrücken dargestellt und von dort zur Durchführung freigegeben. Die in dieser Arbeit eingesetzten Mäuse wurden bei Charles River Laboratories, Research Models and Services Germany GmbH im Alter von sieben bis acht Wochen erworben. Die Haltung erfolgte in einem zugelassenen Mausschrank (Bioscape) unter spezifisch keimfreien Bedingungen. Die Tiere hatten zu jedem Zeitpunkt freien Zugang zu Trockenfutter und Wasser. Einmal wöchentlich wurden Käfige und Wasserflaschen erneuert, die ausreichende Menge Trockenfutter wurde täglich kontrolliert und bei Bedarf zugeführt. Die dargestellten Experimente wurden an Mäusen der in der immunologischen Forschung häufig eingesetzten Inzuchtlinie C57BL/6J oder genetischen Varianten dieser Linie durchgeführt.

### **4.2.2. Anmerkungen zur Anatomie der Maus**

Die Durchführung verschiedener Analysen der Leber derselben Maus macht es notwendig, das Organ aufzuteilen. Um dennoch vergleichbare Bedingungen zu schaffen, wurde jeweils der gleiche anatomische Lappen für jeweils die gleiche Analyse eingesetzt. Die Nomenklatur der Leberlappen ist in der Literatur nicht einheitlich. Dieser Arbeit liegt die Nomina Anatomica Veterinaria in ihrer sechsten überarbeiteten Ausgabe aus dem Jahr 2017 zu Grunde.

### **4.2.3. sublethale Bestrahlung**

Zur Knochenmarkdepletion im Rahmen der Transferexperimente oder zur Bestimmung der Radioresistenz von Zellen wurde eine Ganzkörperirradiation durchgeführt. Nach *Duran-Struuck und Dysko* (Duran-Struuck 2009) sind Ganzkörperdosen von sieben bis dreizehn Gray bei Mäusen myeloablativ, wobei mit höheren Dosen das Risiko strahlenbedingter

Todesfälle steigt. In dieser Arbeit wurden sublethale Ganzkörperbestrahlungen mit 9 Gy durchgeführt. Hierzu wurden bis zu drei Mäuse zunächst in ein autoklaviertes Transportbehältnis aus Kunststoff überführt. Mit diesem Behältnis wurden die Tiere auf den rotierenden Teller des Bestrahlungsgerätes gestellt. Die Mäuse verblieben fünf Minuten im Strahlenfeld einer Cs-137 Quelle, was einer aufgenommen Strahlung von 9 Gy entspricht. Cs-137 ist ein gemischter beta- und gamma-Strahler, der sowohl in der humanen Strahlentherapie als auch regelmäßig in tierexperimentellen Studien zum Einsatz kommt. Nach Abschluss der Bestrahlung wurden die Mäuse drei Tage in einem separaten Käfig gehalten, bevor sie tierschutzkonform getötet wurden. Leber und Milz wurden in der Folge einer durchflusszytometrischen Untersuchung zugeführt wurden (siehe unten).

#### 4.2.3. Knochenmarktransfer kongener Mäuse

Knochenmarktransferstudien wurden modifiziert nach *Duran-Struuck und Dysko* (Duran-Struuck 2009) durchgeführt. Auch pflegerische Hinweise wurden aus dieser Arbeit entnommen. Als Knochenmarkdonoren wurden Mäuse der in Knochenmarktransferstudien regelmäßig eingesetzten Linie C57BL/6-Ly5.1 eingesetzt. Diese Mauslinie wurden 1985 von *Shen* und Kollegen durch Kreuzung der SJL-Mauslinie mit C57BL/6 Mäusen und anschließende 23-fache Rückkreuzung der Abkömmlinge mit C57/Bl6 Mäusen unter bewusster Weiterführung der das Allel Ly 5.1 tragenden Tiere erzeugt. (Shen et al. 1985). Die aus dieser Kreuzungsserie entstandenen Mäuse sind am Locus des Panleukozytenmarkers CD45 (auch bekannt als Ly5) heterozygot mit den allelischen Varianten Ly5.1 aus der SJL-Linie und Ly5.2 aus der C57BL/6-Linie, der sie an allen anderen Genloci gleichen. Unter den Nachkommen, die diese Individuen miteinander zeugen, sind entsprechend der Mendelschen Segregationsregel ein Viertel homozygot für das Allel Ly5.1. Diese letztgenannten Mäuse bilden die Grundlage für die hier verwendete Mauslinie.

Zur Präparation des Knochenmarks wurden die Mäuse zunächst mit Isofluran anästhesiert. Anschließend wurde die Maus durch manuelle zervikale Dislokation getötet und auf einem Präparierbrett mit Nadeln fixiert. Nach Darstellung der Ober- und Unterschenkelmuskulatur wurden beide Hinterbeine auf Höhe des Hüft- und des Sprunggelenkes mit einer Präparierschere abgetrennt und in eine Petrischale überführt. Hier wurde die Muskulatur abgesetzt und die Knochen der unteren Extremität vollständig skelettiert. In der Folge wurde das Os femoris oberhalb der Epikondylen und das proximale Ende möglichst randnah mit der Schere durchtrennt. Ebenso wurde das Caput



tibiae und das distale Tibiaende entfernt. Das Knochenmark wurde mit 2ml sterilem 4mM EDTA in PBS aus den Diaphysen ausgewaschen und in der Petrischale aufgefangen. Durch sanftes Mischen mit einer Pipette wurden Aggregate aufgelöst. Anschließend wurde das Mark aller vier Knochen (beide Femora und Tibiae) gepoolt, in ein autoklaviertes 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und mit 300 RPM für 3 min bei 4°C zentrifugiert. Nachfolgend wurde das Sediment in 2 ml PBS resuspendiert und 10 µl zur Bestimmung der Zellzahl entnommen. Diese wurde mittels MACSquant (Miltenyi, Bergisch Gladbach) durchgeführt. Zum Abschluss der Transplantation wurden  $2 \cdot 10^6$  Zellen in 100 µl PBS in die Schwanzvenen der Akzeptormäuse injiziert. Das gepoolte Knochenmark einer Donormaus wurde auf vier Akzeptormäuse aufgeteilt. Nach der Transplantation wurden die Mäuse sechs Wochen in separaten Käfigen gehalten bevor Leber und Milz der Tiere durchflusszytometrischen Untersuchungen zu geführt wurden. Während der ersten zwei Wochen wurde dem Wasser Enrofloxacin (Baytril®) nach Herstellerangabe zugesetzt, um eine Infektionserkrankung zu vermeiden.

#### *4.2.4. Durch hitzeinaktiverte Propionibacterium acnes induzierte Hepatitis*

Für die experimentelle Simulation der granulomatösen Hepatitis diente das Modell, dass auch bei Yoneyama und Kollegen Anwendung fand, als Vorbild, weil hier myeloischen Zellen, insbesondere Dendritischen Zellen eine besondere Rolle bei der Auflösung der Entzündungsreaktion zukommt. (Yoneyama et al. 2000). Auch bei der Ausbildung der entzündlichen Läsionen weisen die Autoren Makrophagen eine entscheidende Rolle zu.

Die von den Autoren als Granulome beschriebenen Herde erinnern lichtmikroskopisch an die von Blériot et al. beschriebenen „Mikroabszesse“, deren Formation in der Frühphase der hepatischen Entzündung auftritt und in deren Initiation Kupffer-Zellen eine besondere Rolle zugeschrieben wird. (Blériot et al. 2015)

Die Bakterien für diese Experimente wurden im Institut für Mikrobiologie und Hygiene (Leiter: Prof. Dr. Mathias Herrmann) von Frau Anna Nimmesgern kultiviert und inaktiviert. Hierzu wurden zunächst bei -80°C tiefgefrorene P.acnes (Stamm ATCC11828, Lot 59679234) auf Columbia-Agar (Biomérieux, Marcy-l'Étoile) für zwei Tage bei 37°C aufgetaut. Anschließend wurden diese in einer Thioglycollat-Bouillon-Flüssigkultur (Graso biotech, Krag) für zwei Tage bei 37°C bebrütet. Zur Hitzeinaktivierung wurden die Kultur zunächst bei 2000 g für 10 min zentrifugiert und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Bakterien bei 65°C für 30 min hitzeinaktiviert, für 2000 g für 10 min zentrifugiert und in 1,5 ml Reagiergefäße mit zuvor einzeln bestimmter Masse

aliquotiert.

Aliquot.	Leermasse Gefäß [g]	Gesamtmasse [g]	Bakterienmasse [mg]
1	0,9989	1,0094	10,5
2	0,9974	1,0071	9,7
3	0,9986	1,0087	10,1
4	0,9998	1,0089	9,1
5	1,0055	1,0167	11,2

Tabelle 4: Bakterienmassen

Nach einer erneuten Zentrifugation bei 2000 g für 10 min wurde der Überstand verworfen und die Gesamtmasse von Sediment und Reagiergefäß bestimmt.

Durch Differenzbildung konnte die Feuchtmasse der Bakterien bestimmt werden (siehe Tab.4). Anschließend wurde das Sediment in 1 ml PBS resuspendiert und in der Klinik für Innere Medizin II bei -80°C gelagert. In der vorliegenden Arbeit werden durch die Injektion

hitzeinaktiverter *P.acnes* entzündliche Herde erzeugt, ähnlich dem Modell, das von Yoneyama et al. vorgestellt wurde. In der Literatur hierzu werden den Versuchsmäusen 100 µg *P.acnes* in 100 µl sterilem PBS injiziert. Allerdings treffen die Autoren weder eine Aussage zum Grad noch zur Art der entzündlichen Veränderung in Bezug auf das gesamte Organ. Andere Autoren verwenden mit 20 µg zudem bedeutend geringere Injektionsdosen (Schlecht et al. 1997) Um sicherzustellen, dass beobachtete Veränderungen ausschließlich durch die primäre Reaktion auf *P.acnes* und nicht

auf sekundäre Phänomene durch entzündliche Gewebsveränderungen zurückzuführen sind, wurde zunächst eine Injektionsdosis bestimmt, bei der fokale entzündliche Veränderungen ohne Nekrosen oder Einblutungen nachweisbar waren. Hierzu wurden

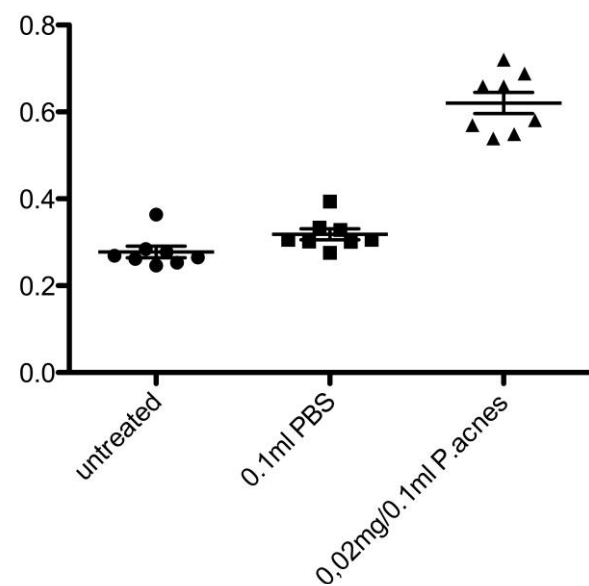
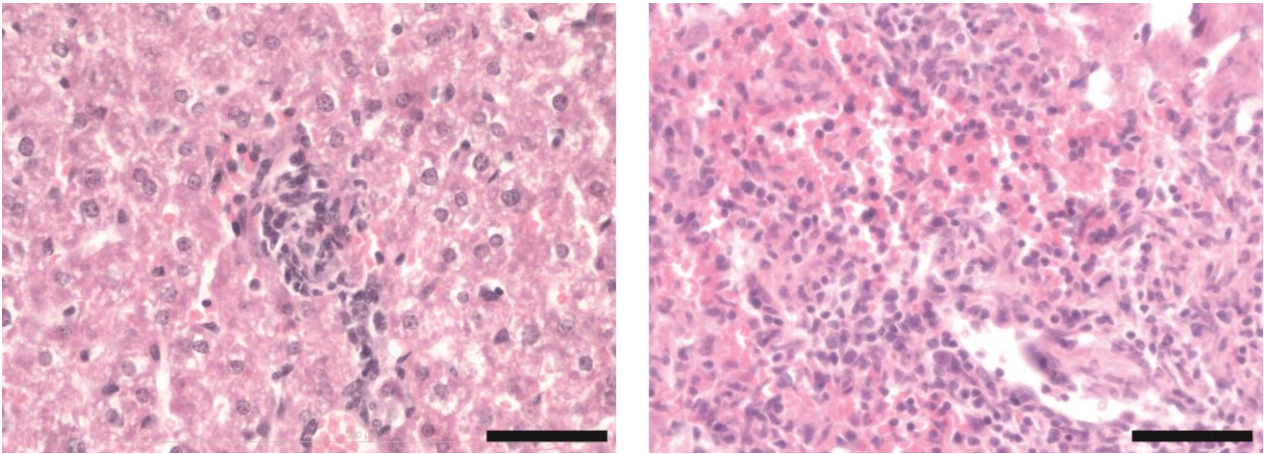


Abbildung 4: Splenomegalie nach Injektion verschiedener Dosen von hitzeinaktivierten *P.acnes*. Milzgewicht in Prozent des Körpergewichts.

zwei verschiedene Dosen und eine Negativkontrolle injiziert und die Mäuse nach sieben Tagen getötet. Die Injektion führte zu einer Splenomegalie unterschiedlichen Ausmaßes (Abb. 4). Die Lebern der Tiere wurden einer histologischen Auswertung zugeführt. (Siehe Abb. 5 und vgl. Kapitel 5.12).



*Abbildung 5 Repräsentative Ausschnitte von H&E gefärbten Paraffinschnitten von Mäuselebern. Links bei 20µg , rechts bei 100µg P.acnes Injektion. Maßstab zeigt 50µm an.*

#### 4.2.5. NASH durch methionin- und cholindefiziente Diät

Zur Simulation einer nichtalkoholischen Steatohepatitis kommen in der Literatur verschiedene Tiermodelle zum Einsatz. (Jacobs et al. 2016, Kucera et al. 2014).

Diese können grob in nicht-diätische und diätische Modelle unterschieden werden. Die letztgenannte Gruppe lässt sich wiederum unterteilen in Diätmodelle, die Steatose und Steatohepatitis primär durch eine hyperkalorische Diät erreichen und solche, die primär defizient an essentiellen Nahrungsbestandteilen sind. Der meistverwendete Vertreter der zweiten Gruppe ist die methionin- und cholindefiziente Diät (MCD), in der eine Sucrose-reiche Diät, die weder Methionin noch Cholin beinhaltet über 4-8 Wochen appliziert wird. Mäuse, die auf diese Art behandelt werden, zeigen eine deutliche Gewichtabnahme und niedrige Lipoproteinspiegel, entwickeln jedoch bereits in den ersten Wochen eine milde bis mäßige Steatose und Steatohepatitis (Heier et al. 2017). *Machado et al.* haben diese Diät mit einer ebenfalls häufig verwendeten fettreichen, methionin- und cholinhaltigen Diät unter Berücksichtigung verschiedener Faktoren und insbesondere ihrer Entsprechung im Menschen verglichen (Machado et al. 2015). Sie konnten zeigen, dass die MCD nicht nur in Bezug auf grobe morphologische Kriterien deutlich von der menschlichen Variante der NASH abweicht, sondern auch deutliche Diskrepanzen auf hormoneller, chemischer und zellbiologischer Ebene bestehen, die insbesondere mit der Abwesenheit von Kriterien des metabolischen Syndroms zusammenhängen, in dessen Kontext die NASH im Menschen gehäuft auftritt.

Allerdings zeigte sich bei MCD-behandelten Mäusen eine entzündliche Reaktion, die sowohl stärker ausgeprägt war als im rein hyperkalorischen Modell als auch der humanen Reaktion aus pathophysiologischer Sicht eher nahe kam. Da in dieser Arbeit insbesondere die Reaktion von Makrophagen bei entzündlichen Prozessen beurteilt werden sollte, wurde trotz der bestehenden und beschriebenen Mängel das MCD-Modell für die Betrachtung von muriner Steatohepatitis gewählt.

Hierzu wurden C57/Bl6-Mäuse im Tierstall der Klinik für Innere Medizin II gehalten und über 5 Wochen mit einer Diät, die der von Machado et al. verwendeten entspricht (Research Diets, USA), oder einer isokalorischen, methionin- und cholinhaltigen Kontrolldiät behandelt. Anschließend wurden die Mäuse wie oben beschrieben getötet. Der Lobus hepaticus dexter wurde für Paraffinschnitte präpariert (vgl. Kapitel 3.4.1), der Lobus hepaticus sinister wurde für durchflusszytometrische Analysen eingesetzt (vgl. Kapitel 3.5.1.). Die Pflege der MCD-behandelten Mäuse erfolgte durch Eva-Carina Heier, die

ebenso in manchen Experimenten die Präparation der Leberlappen und der Einzelzellsuspensionen übernahm.

#### ***4.2.6. Homozygote BATF3-Knockoutmäuse***

Da das myeloische Netzwerk der Leber eine zentrale Stütze insbesondere der frühen Immunantwort darstellt und Kreuzaktivierungen zwischen verschiedenen Zellen der myeloischen Reihe darin involviert sind (Eckert et al. 2015) wurde ein Modell genetisch alterierter Mäuse eingesetzt, in dem durch ein homozygoten Knockout von BATF3, einem Transkriptionsfaktor der AP-1-Familie, CD8-exprimierende dendritische Zellen nicht ausgebildet werden (Hildner et al. 2009). Diese Zellen leisten einen wichtigen Beitrag zur Kreuzpräsentation von Antigenen (den Haan et al. 2000) und damit zur zellulären Immunantwort bei verschiedenen Infektionen (Martinez-Lopez et al. 2015, Mashayekhi et al. 2011, Edelson et al. 2011). Aus diesem Grund sollte evaluiert werden, ob diese Familie von dendritischen Zellen oder der Transkriptionsfaktor BATF3 direkt auf die Zusammensetzung des Kupffer-Zell-Kompartiments einen Einfluss ausübt, weswegen die homozygoten Knockout-Tiere in die MCD-Experimente miteinbezogen wurden.

Der verwendete Mausstamm wurde von Jackson Laboratories (Bar Harbor, USA) erworben und im Tierstall der Klinik für Innere Medizin II gehalten. Die Tiere erhielten die oben geschilderte MCD-Diät oder eine entsprechende Kontrolle und wurden nach einer oder fünf Wochen in der unter 3.5.1. geschilderten Weise der histopathologischen oder durchflusszytometrischen Analyse zugeführt.

### ***4.3 Zellkulturtechniken***

#### ***4.3.1. Anlage einer Primärkultur der Leber***

Zur Anlage einer Primärkultur aus Lebern wurde die Leber je eines Tieres wie oben ausgeführt (siehe Kapitel 4.5.1.) enzymatisch aufgeschlossen und die Einzelzellsuspension mit Hilfe eines Durchflusszytometers gezählt. Außerdem wurde eine 10 cm durchmessende Zellkulturschale mit Collagen Ia (ThermoFisher, USA) verdünnt in sterilem PBS bei 37°C für mindestens eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Schale dreimal mit sterilem PBS gespült und mit 10ml Zellkulturmedium vorgefüllt. Aus der

angefertigten Einzelzellsuspension wurden  $2 \cdot 10^7$  lebende Zellen in 3 ml des Kulturmediums resuspendiert und vorsichtig in die Kulturschale (Sarstedt, Nümbrecht) gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt über Nacht um es adhären Zelltypen möglich zu machen zu sedimentieren und am Boden des Gefäßes anzuhaften. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und die Schale dreimal mit sterilem PBS gewaschen, wobei der Überstand und nicht adhären Zellen verworfen wurden. Während der Kulturzeit wurde das Medium alle drei Tage erneuert, indem das alte Medium verworfen, die Kulturschale einmal mit sterilem PBS gespült und mit je 10 ml Kulturmedium gefüllt wurde. Nach zwölf Tagen wurde die Kultur einer durchflusszytometrischen Analyse zugeführt (siehe Kapitel 3.5.2.).

#### 4.3.2. RAW-Macrophagen

Bei der in dieser Arbeit verwendeten RAW-Linie, handelt es sich um ein Derivat der von Raschke und Kollegen eingeführten RAW 264 Zelllinie (Raschke et al., 1978). Diese entstammt dem Aszites einer männlichen BAB/14-Maus, der nach intraperitonealer Vorbehandlung mit Pristan das lymphominduzierende A-MuLV (Abelsons Murines Leukämievirus) ebenfalls intraperitoneal injiziert wurde. Raschke und Kollegen demonstrieren zwar, dass die virustransformierten Zellen weiter einen für Macrophagen typischen Phänotyp zeigen, eine differenzierte Analyse der Abstammung oder Differenzierung<sup>11</sup> dieser Zellen wird von den Autoren nicht vorgelegt. Die einfache Handhabung und prinzipiell unbegrenzte Verfügbarkeit dieser Zellen machen sie dennoch zu häufig eingesetzten Vergleichsmodellen der Makrophagenbiologie. (Berghaus et al. 2010).

Die in den dargestellten Experimenten eingesetzten Zellen stammen von der American Type Culture Collection (ATCC) mit einer unklaren Anzahl vorangegangener Passagen. Sie wurden in einem Flüssigstickstofftank bei -196°C in einem sterilen Medium aus 20% DMSO und 80% Kulturmedium gelagert. Vor dem Ausplattieren wurden sie vorsichtig auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 12 ml sterilem Kulturmedium verdünnt und gänzlich in eine Kulturflasche (Sarstedt, Nümbrecht) gefüllt. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt, Am ersten Tag nach dem Auftauen

---

<sup>11</sup> Zur Vielfalt der Intraabdominell vorkommenden phagozytären Zellpopulationen vergleiche: Cassados et al 2015, Ghosn et al. 2009

wurde das Medium entfernt und die Kulturflasche dreimal mit sterilem PBS gespült um Zelltrümmer zu entfernen. In der Folge wurde die Viabilität und Dichte der Zellkultur täglich überprüft. Das Medium wurde an jedem zweiten Tag gewechselt. Bei 90% Konfluidität in der Kultur wurden die Zellen mit 3 ml Lösung aus 0.05% Trypsin, 4 mM EDTA in sterilem PBS für zwei Minuten bei 37°C inkubiert und in der Folge geschüttelt um sie vom Boden der Kulturflasche abzulösen. Die trypsinhaltige Lösung wurde durch Zugabe von 15 ml Kulturmedium stark verdünnt. Anschließend wurde die Zellsuspension für 4 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und 1 ml dieser Suspension zusammen mit 15 ml sterilem Kulturmedium in eine neue Kulturflasche verfüllt. Zwischen dem Ausplattieren einer Zellportion und dem erneuten Teilen lag in der Regel eine Woche. Die Zahl derartiger Passagen wurde notiert und überschritt in keinem Experiment fünf.

#### ***4.4. histologische Techniken***

##### ***4.4.1. Anfertigen und Färben von Paraffinschnitten***

Zur Anfertigung von in Paraffin eingebetteten Schnitten wurde der Lobus medialis dexter der Maus mit einer anatomischen Pinzette nach kranial mobilisiert und mit der Schere vorsichtig die parenchymatöse Verbindung mit der restlichen Leber gelöst. Um Quetschartefakte zu vermeiden wurde der isolierte Lappen sanft mit den Schenkeln einer anatomischen Pinzette angehoben und in ein 15 ml-Gefäß übertragen. In diesem Gefäß wurde der Lappen über Nacht analog der Anleitung von Romeis (Romeis 2010, S. 90ff) in 4% Paraformaldehyd (Morphisto, Frankfurt/Main) inkubiert.

##### ***4.4.2. Anfertigen und Färben von Kryoschnitten***

Zur Anfertigung von Kryoschnitten wurde der Lobus medialis dexter der Leber wie oben dargestellt präpariert und in 4% Paraformaldehyd über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Präparat mit einer aufsteigenden Sucrosereihe entwässert und anschließend in Kryoschnittmedium eingebettet auf Trockeneis in das Institut für Anatomie verbracht, wo von Frau Marion Schwarz entsprechende Kryotomschnitte angefertigt wurden. Aus jedem Lappen wurden 3x3 Schnitte angefertigt. Zwischen jedem Dreierblock lag ein Abstand von 500 µm. Diese wurden bei -80°C gelagert. Zur Färbung wurde der zu färbende Schnitt aus

dem Gefrierschrank entnommen und bei Raumtemperatur vom Kondenswasser getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte 15min entweder mit Paraformaldehyd überschichtet oder in ein mit Aceton gefülltes, geschlossenes Gefäß getaucht.

## **4.5. Durchflusszytometrie**

### *4.5.1. Herstellen einer Einzelzellsuspension aus Geweben*

Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension für die Durchführung durchflusszytometrischer Analysen wurde, nach der eventuellen Entfernung des Lobus medialis dexter zur histologischen Auswertung, zunächst die Pfortader vom Leberhilus an dargestellt. Anschließend wurde die Pfortader unter Sicht circa 5 mm vom Hilus entfernt mit einer Hohlnadel punktiert und, nach Durchtrennung der Vena cava caudalis circa 5mm kaudal der Leber, mit zuvor auf 37°C vorgewärmten Verdaupuffer mit einer Flussgeschwindigkeit von 5 ml/min vorsichtig perfundiert.

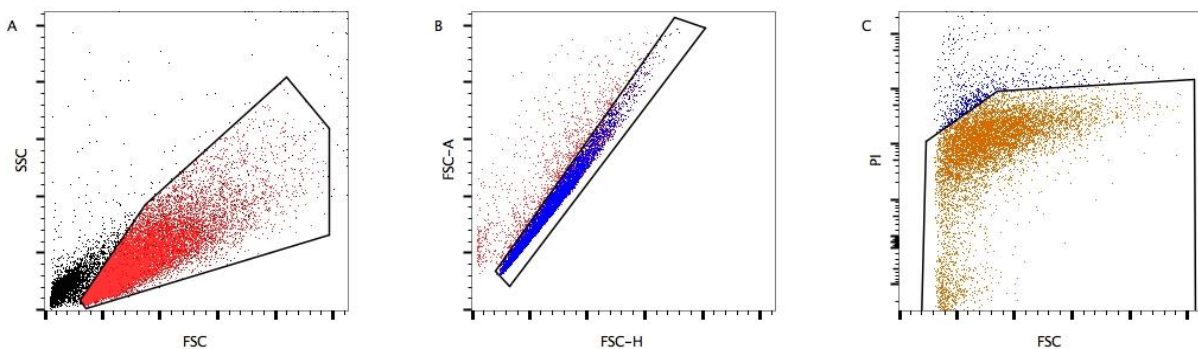
Die Perfusion wurde unterbrochen, sobald die Farbe der Leber makroskopisch gänzlich von dunkelrot in lehmgelb umgeschlagen war, was als Indiz für eine vollständige Spülung des Organs mit Verdaupuffer gewertet wurde. Je nach Fragestellung wurde in der Folge der Lobus medialis sinister von der Leber abgesetzt oder das ganze Organ von den es umgebenden Bandstrukturen befreit und in einer mit PBS gefüllten Petrischale auf Eis gelagert.

Der entnommene Teil der Leber wurde im Anschluss mittels Skalpell und Pinzette vorsichtig in ungefähr 0,5 mm durchmessende Stücke zerschnitten. Diese wurden in ein 15 ml Plastikreagiergefäß überführt, mit 1,6 ml Verdaupuffer überschichtet, einmal geschüttelt und in ein auf 37°C vorgewärmtes Wasserbad überführt. Alle 5 min wurden der Inhalt der derart vorbereiteten Reagiergefäße durchmischt, zu Beginn der enzymatischen Lyse durch vorsichtiges Schütteln, nach ca. 15 min durch sorgsames auf- und abpipettieren mit einer Pipette. Der Überstand, bestehend aus enzymhaltigen Verdaupuffer und in Suspension befindlichen Zellen. wurde alle 5min abgenommen und durch ein Nylonsieb (Porengröße 100 µm) in ein separates, auf Eis gekühltes Reagiergefäß überführt. Diese Suspensionen wurden alle 10 min für 4 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Der nunmehr enzymhaltige Überstand wurde verworfen, das Sediment wurde in 800 ml Sammelpuffer aufgenommen, in ein drittes Gefäß überführt und bis zum Ende der Prozedur auf Eis aufbewahrt. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis der



Überstand im zum Verdau eingesetzten Gefäß keine Trübung mehr zeigte.

Die Suspension von Zellen in Sammelpuffer, die sich jetzt in einem Reagiergefäß befand, wurde wieder für 4 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde zur Durchführung durchflusszytometrischer Analysen so in FACS-Puffer resuspendiert, dass sich das Gesamtvolumen der Suspension von 3 ml ergab, was an der Skala auf dem Reagiergefäß abgelesen werden konnte. Waren in der Folge Prozeduren geplant, die einen unveränderten zellulären Stoffwechsel notwendig machten, wurde an dieser Stelle wieder der Sammelpuffer verwendet, da das im FACS-Puffer enthaltene Natriumazid durch Hemmung der mitochondrialen Atmungskette die ATP-Synthese irreversibel hemmt. Allerdings wurde ebenso ein Gesamtvolumen von 3 ml eingestellt.



*Abbildung 6: Gates zur Bestimmung der Lebendzellzahl in Suspension: In einem ersten Schritt wurde azellulärer Debris unter Zuhilfenahme des forward scatters und des sideward scatters ausgeschlossen (Zellen entsprechen roten Events). Anschließend wurden unter Zuhilfenahme der Fläche und Höhe des FSC-Signals Doubletten ausgeschlossen (Einzelne Zellen entsprechen blauen Events). In einem letzten Schritt wurden avitale Zellen unter Verwendung von Propidiumiodid (PI) ausgeschlossen.*

Die Zellkonzentration wurde durch Einsatz des MACSquant Durchflusszytometers bestimmt. Zu diesem Zweck wurden 20 µl aus der Ausgangssuspension entnommen und in 177 µl FACS-Puffer überführt. Zum Ausschluss toter Zellen wurde der Mischung 3 µl Propidiumiodid (im folgenden PI) hinzugefügt. Hierbei handelt es sich um einen DNA-Interkalator, der die Membran von toten Zellen überwinden kann, in lebende Zellen aber nicht eindringen kann. Anschließend wurden 50 µl aus diesen 200 µl wie unten dargestellt gezählt, wobei die in Abbildung 6 dargestellten Gates zum Einsatz kamen.

#### 4.5.2. MACS

Zur magnetgestützten Zellsortierung wurde der autoMACS separator der Firma Miltenyi verwendet. Zur Präparation der Probe wurde der Ertrag einer gesamten Leber in

Einzelmenngen à  $10^7$  Zellen aufteilt. Jede dieser Einzelmenngen wurde zunächst für 10 min mit 10µl Fc-Block (miltenyi) in 100 µl MACS-Buffer (Miltenyi) auf Eis inkubiert. Nach einem Waschgang mit MACS-Puffer wurde der Überstand vollständig verworfen. Anschließend erfolgte eine 15 min Inkubation mit 5 µl anti-F4/80 Beads (Miltenyi), Antikörpern welche mit kleinen Eisenkügelchen gekoppelt wurden, in 100 µl MACS-Puffer auf Eis. Im Anschluss folgten drei Waschgänge, je mit 1 ml MACS-Puffer, an deren Ende die Überstände vollständig verworfen wurden. In der Folge wurden die Einzelsellsuspensionen in 2 ml MACS-Buffer gepoolt und durch das Gerät unter Zuhilfenahme eines starken Magneten in eine positive und eine negative Fraktion aufgeteilt.

Anschließend wurde die positive Fraktion analog des unten genannten Färbeprotokolls mit Antikörpern gegen ESAM befärbt, welche mit FITC markiert waren. Nach dem letzten Waschschrift wurde nun jedoch nicht eine Messung durchgeführt, sondern die Zellsuspension für 15 min mit den genannten Konzentrationen von Eisenkügelchen auf Eis inkubiert, welche mit einer FITC-bindenden Substanz beschichtet wurden. Anschließend wurde eine erneute Sortierung mittels des autoMACS separator vorgenommen. Die positive Fraktion wurde anschließend wie unten aufgeführt eine durchflusszytometrischen Untersuchung zugeführt.

#### *4.5.3. Analyse der Zellkultur*

Um die in den Kapiteln 4.3.1 und 4.3.2. dargestellten Zellkultursysteme in eine Einzelzellsuspension zu überführen, wurde zunächst das Medium unter der Sterilbank entfernt und verworfen und die Kultur wie oben dargestellt mit PBS gespült. Anschließend wurde der Boden des Kulturgefäßes mit einer Lösung von 4mM EDTA in PBS überdeckt und für 3 Minuten bei 37°C inkubiert. In der Folge wurden die Zellen durch sanftes Schütteln vom Boden des Gefäßes gelöst und in 8 ml Sammelpuffer aufgenommen. Diese Suspension wurde für 4 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde für die Durchführung durchflusszytometrischer Analysen in FACS-Puffer resuspendiert, für die Durchführung funktioneller Analysen in Sammelpuffer. Das in FACS-Puffer enthaltene Natriumazid blockiert den mitochondrialen Stoffwechsel, um die Zellen möglichst nahe am in-vivo-Zustand zu erhalten. Diese Wirkung des Puffers reduziert gleichzeitig die Aussagekraft funktioneller Studien, weswegen hier ein anderer Puffer eingesetzt wurde. Wie oben dargestellt wurde ein Gesamtvolumen von 3ml hergestellt. Die Zählung erfolgte wie unter Punkt 4.5.1. dargestellt.

#### 4.5.4. Präparation der Probe

Zur Färbung der Probe mit Fluorochrom-gelabelten Antikörpern wurden jeweils das 125.000 PI-negativen Zellen entsprechende Volumen aus der wie oben beschrieben angefertigten Suspension entnommen, und in ein separates Eppendorf-Reagiergefäß gefüllt. Dieses wurde anschließend für 4 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde zunächst für 5 min auf Eis in 50 µl einer Mischung aus FACS-Puffer, F<sub>c</sub>-Rezeptor blocking solution (Miltenyi) und nicht mit einem Fluorochrom verbundenem anti-CD64 Antikörper (biolegend) im Verhältnis 4:1:0,1 inkubiert. Anschließend wurden 50 µl einer zuvor hergestellten Lösung Fluorochrom-gekoppelter Antikörper in einer vordefinierten Konzentration (siehe Tabelle 3.1.3.) zugegeben und der Ansatz für weitere 20 min unter Lichtabschluss auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden zur Verdünnung noch in Lösung befindlicher Färbereagenzien 400 µl FACS-Puffer hinzugegeben und der gesamte Ansatz erneut für 4 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 200 µl FACS-Puffer mit 1,5 µl PI resuspendiert und 3 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Messung dieser Probe wie unten beschrieben.

#### 4.5.5. Messaufbau

Zur Anfertigung der in dieser Arbeit präsentierten durchflusszytometrischen Analysen kam der MACSquant Analyzer 10 der Firma Miltenyi Biotech zum Einsatz. Das Gerät verfügt über 3 Laser der Wellenlängen 405 nm, 488 nm sowie 638 nm. Vorwärtsstreulicht (Forward scatter, FSC) und

Seitwärtsstreulicht

(Sideward scatter, SSC)

werden über den blauen Laser bestimmt. Außerdem

können mit 5

verschiedenen Filtern

insgesamt 10

verschiedene Kanäle

(FSC, SSC und 8

Farbkanäle) unterschieden

werden.

(Siehe Abbildung 7). Für gleich präparierte Zellgemische wurden jeweils gleiche Laserspannungen eingesetzt, die für jede Mischung einmalig vorbestimmt wurden. Da einige Farbstoffe nach Anregung Photoemissionen mit überlappenden Spektren zeigen, wurde unter Zuhilfenahme Antikörperbindender Mikrobeads (Miltenyi, Bergisch Gladbach) für jedes Färbeprotokoll eine passende Kompensation mit dem automatischen Kompensationsprogramm des Messgeräts durchgeführt. Diese wurde jeweils manuell nachgeprüft und, wo notwendig, verbessert.

Zur Messung wurde die zuvor wie oben dargestellt präparierte Probe einmal durch Pipettieren gemischt und dann in die dazu vorgesehene Öffnung des Messgeräts gefüllt. Nach Starten des Messvorgangs wurden 150 µl der gefärbten Probe zur Messung angesaugt. Die verbliebenen 50 µl wurden verworfen. Bei der Messung wurde die Flussgeschwindigkeit im Gerät so gewählt, dass nicht mehr als 10.000 Events/Minute detektiert wurden.

Aus den detektierten Emissionsintensitäten legt die Gerätesoftware Dateien im .fcs-Format an. Diese wurden für die weitere Datenverwertung auf einen stationären MAC übertragen.

Laser	Channel	Filter (nm)	Dye or parameter
Violet 405 nm	V1	450/50	CFP, VioBlue
	V2	525/50	Pacific Orange™, VioGreen
Blue 488 nm	B1	525/50	GFP, FITC
	B2	585/40	PE
	B3	655-730	PI, PerCP, PE-Cy™5.5, PerCP-Vio700, PE-Vio615, ECD, PE-CF594, PE/Dazzle™ 594, PE-eFluor® 610
	B4	750 LP	PE-Cy7, PE-Vio770
Red 635 nm	R1	655-730	APC
	R2	750 LP	APC-Cy7, APC-Vio770
Blue 488 nm	FSC	488/10	Size
	SSC	488/10	Granularity

Abbildung 7: Channel des Miltenyi MACSquant Analyzer (Quelle Miltenyi Biotech)

## **4.6. Analysen, Berechnungen, Software**

### *4.6.1. Analyse durchflusszytometrischer Daten*

Durchflusszytometrische Daten wurden als .fcs-Datei analysiert. Hierzu wurde das Analyseprogramm FlowJo 10.0.8 (FlowJo LLC, USA) verwendet. Bei der Analyse wurden zunächst Events mit sehr niedrigen FSC und SSC-Werten aus der weiteren Analyse ausgeschlossen (vgl. Abb. 6). Hierbei handelt es sich vor allem um Zelltrümmer und sehr kleine Gewebsfragmente. Anschließend wurde eine sehr strenge Doublettenexklusion durchgeführt. Hierzu wurde ausgenutzt, dass die Messsoftware für jedes detektierte Event nicht nur die maximale Emissionsintensität speichert, sondern auch die Fläche unter der Intensitäts-Zeitkurve. Unter der Annahme weitestgehend runder Zellen und der gerätetechnisch vorgegebenen konstanten Passagegeschwindigkeit verhalten sich diese beiden Größen annähernd linear zueinander. Datenpunkte, die sich einem derartigen linearen Zusammenhang entziehen, wurden als Doubletten interpretiert und bei der weiteren Betrachtung exkludiert. Bei sehr großen Zellen, die bei der Vereinzelung im Durchflusszytometer eine stärkere Deformierung erfahren, kann der lineare Zusammenhang zwischen Signalintensität und Fläche unter der Intensitätskurve nicht mehr vollständig angenommen werden. Dieses Phänomen ist abhängig von der Methode der Vereinzelung und wird derzeit in der einschlägigen Literatur nur sehr unzureichend diskutiert (Cossarizza et al. 2017). Anschließend wurde eine Exklusion toter Zellen durchgeführt. Hierzu wurden alle Zellen die während des Färbevorgangs nicht mehr dazu in der Lage waren Propidiumiodid aus ihrem Inneren zu entfernen und die sich demnach PI-positiv darstellten aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Im Anschluss wurden entsprechend der verwendeten Marker unterschiedliche Gatingstrategien angewendet, die im Detail im Zusammenhang mit den entsprechenden Experimenten dargestellt werden.

#### *4.6.2. Analyse von Bilddaten*

Die mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten Paraffinschnitte wurden in der Klinik für Innere Medizin II betrachtet. Zur Darstellung der UV-Fluoreszenz von Schaumzellen wurde ein UV-Laser mit Blaufilter verwendet. Zur Aufnahme von Photographien diente eine am Mikroskop befestigte Fotokamera. Anschließend wurden die Bilder im .jpg-Format gespeichert. Zur weiteren Prozessierung wurde ImageJ in der Version 1.49 verwendet. Zur Flächenanalyse wurden die Bilder zunächst in drei Einzelfarbkanäle (rot, blau, gelb) gespalten. Anschließend wurde für die Schaumzellflächenanalyse im blauen, für die Kernflächenanalyse bei der Quantifizierung des Entzündungsinfiltrats im roten Kanal ein Schwellenwert festgesetzt, über dem die Farbtintensität möglichst vieler Zellkerne bei der Entzündungsquantifikation, beziehungsweise Schaumzellen bei der Schaumzellanalyse liegt. Nur Pixel über diesem Schwellenwert wurden ausgezählt und anschließend ins Verhältnis mit der Gesamtpixelzahl gesetzt. Pro Organ wurden mindestens drei Schnitte mit mindestens 500 µm Abstand ausgezählt, von jedem Schnitt wurden zehn zufällig aufgenommene Bilder in der Zählung berücksichtigt. Anschließend wurde das arithmetische Mittel für ein Organ gebildet. Dieser Wert wurde für die weitere statistische Auswertung verwendet.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. PDCA-1 wird von Kupferzellen exprimiert

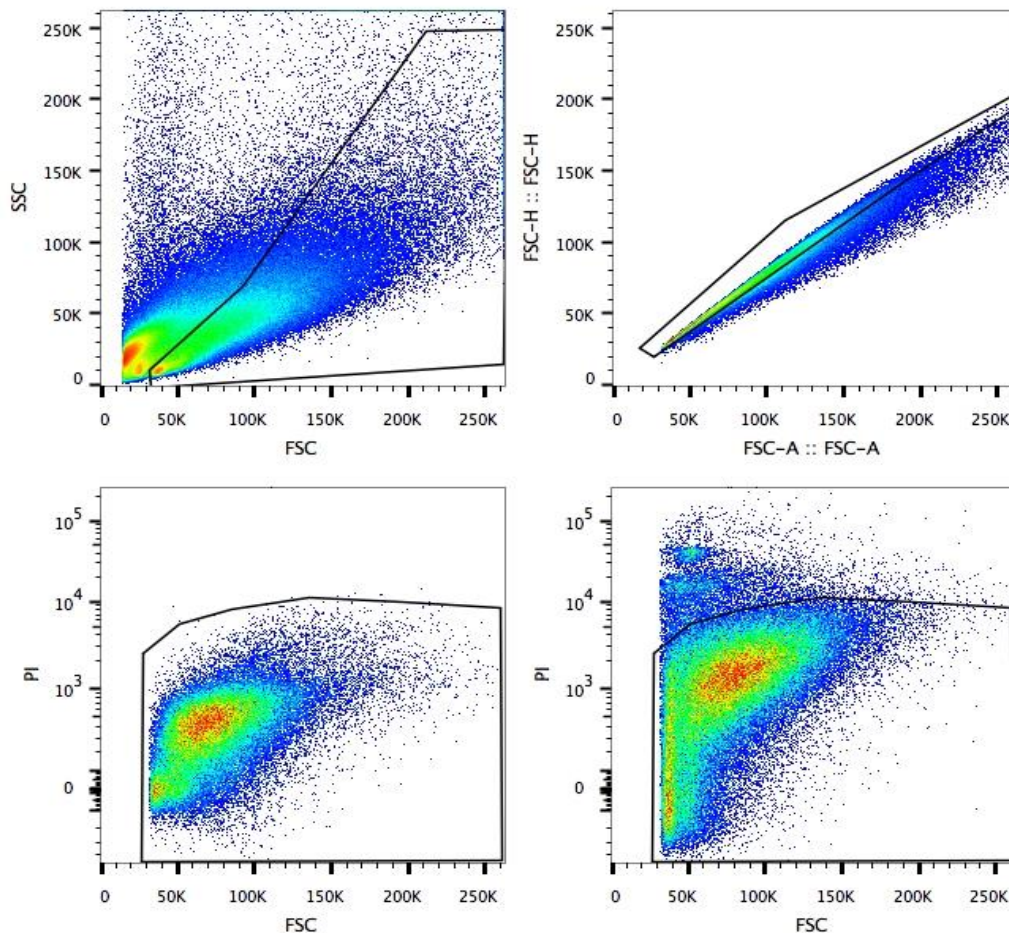


Abbildung 8: Allgemeines Pregating: Zunächst wurde anhand der Granularität (SSC) und der Größe der Zellen (FSC) kleine, hypergranulare Events aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Hierbei handelt es sich vorwiegend um zellulären Debris (obere Zeile, links). In einem nächsten Schritt wurde unter Zuhilfenahme der Fläche unter der FSC-Kurve, sowie der maximalen Höhe der FSC-Kurve ein strenger Doublettenausschluss durchgeführt (obere Zeile, rechts). Anschließend wurden vitale Zellen anhand ihrer fehlenden Anfärbbarkeit für Propidiumiodid (PI) ausgewählt (untere Zeile, links Nullkontrolle, rechts +3µl PI). Diese Zellen bildeten die Grundlage für weitere Berechnungen.

PDCA-1 wurde zunächst als Membranprotein von Knochenmarkstromazellen und Nabelschnurendothelzellen beschrieben, das das Wachstum von B-Zellvorläufern stimuliert (Kaisho et al. 1994). In der aktuellen Literatur wird das Molekül, auch als BST-2 oder CD 317 bezeichnet, allerdings vornehmlich zur Identifizierung von plasmazytoiden Dendritischen Zellen und B-Zell-Subgruppen verwendet (vgl. Bierly et al. 2008).

Ein Antikörper gegen PDCA-1 ist derzeit kommerziell erhältlich und wird in Studien zur Depletion von plasmazytoiden Dendritischen Zellen eingesetzt (vgl. Wittmann et al. 2013 oder Davidson et al. 2014).

Die Expression von PDCA-1 konnte auch auf anderen Makrophagengruppen nachgewiesen werden, sodass dieses Molekül auch als Kandidat für einen neuen hepatischen Makrophagenmarker in Frage kommt (Nobumoto et al. 2009).

Zur Untersuchung der Expression auf Lebermakrophagen wurde die dargestellte Gatingstrategie eingesetzt (Abb. 8): Zunächst wurden mithilfe des verbreiteten Leukozytenmarkers CD 45 nicht-leukozytäre Zellen ausgeschlossen. Diese Gruppe umfasst im Wesentlichen die Endothelzellen der Lebersinus (LSECs), Fibroblasten und Myofibroblasten des Disse'schen Raums, hepatische Sternzellen und „oval cells“, mesenchymale Stammzellen der Leber. In einem nächsten Schritt konnten Kupffersche Zellen auf der Basis der Literatur (vgl. Blériot et al. 2015) durch die Kombination der Marker F4/80 und Ly6C identifiziert werden.

Während F4/80 als spezifisch für organoresidente Makrophagen angesehen wird (vergleiche Kapitel 3.2.), dient Ly6C vor allem der Unterscheidung dieser Gruppe von Makrophagen hämatopoetischen Ursprungs. Bei Ly6C handelt es sich um ein Epitop des Oberflächenmoleküls Gr1, vereinzelt findet die Bezeichnung Gr1 auch synonym zu Ly6C Anwendung. Dies ist streng genommen nicht korrekt, da Gr1 die beiden Epitope Ly6C und Ly6G umfasst. Auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten und unreifen Monozytenvorläufern im Knochenmark binden sowohl Antikörper gegen das Epitop G als auch gegen das Epitop C.

Die Variante Ly6C wird in hohem Maße auf bestimmten Subtypen von Monozyten und inflammatorischen Makrophagen, aber im steady state nur schwach von gewebsresidenten Makrophagen exprimiert (Epelman et al. 2014, Brempele et al. 2016).



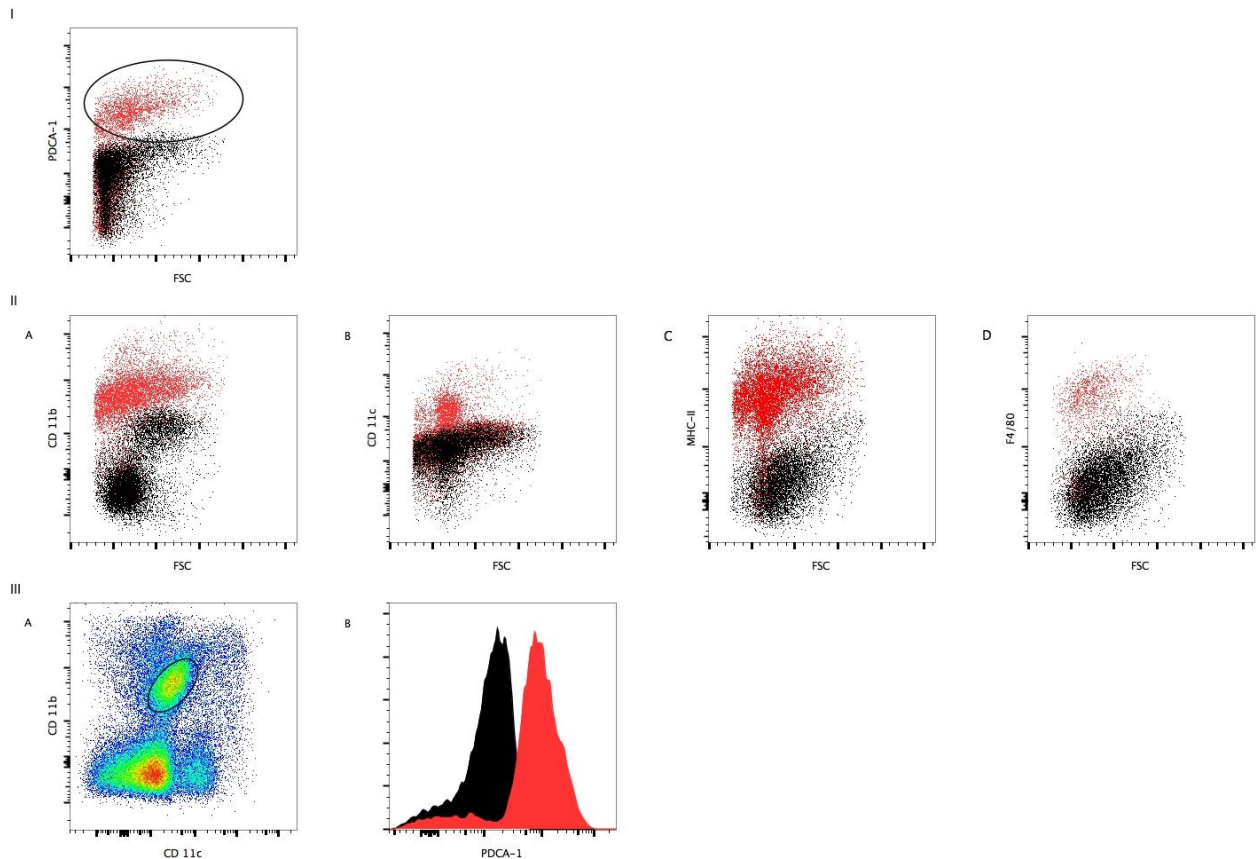


Abbildung 9: Expression von PDCA-1 innerhalb des CD45 positiven Kompartiments der Leber. **I** PDCA-1-Expression innerhalb der CD-45 positiven Zellen der Leber in Abhängigkeit von der Zellgröße (FSC). wird vorwiegend von Zellen mit großen Zelleibern exprimiert (erste Zeile). **II** Expression von CD 11b (**A**), CD 11c (**B**), MHC-II (**C**) und F4/80 (**D**) von CD 45 positiven, PDCA-1 positiven Zellen. **III** PDCA-1 Expression von Kupferzellen (markierte Population in **A**) in **B**. In schwarz ist jeweils das Ergebnis der jeweiligen Isotypenkontrolle dargestellt, in rot das Ergebnis der spezifischen Färbung. Achsenbeschriftung der Dot plots in arbiträrer Einheit. Abszisse der Histogramme in arbiträrer Einheit. Ordinate der Histogramme in Prozent. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Es lässt sich zeigen, dass CD 11b schwach positive, CD 11c negative Kupferzellen deutlich positiv für PDCA-1 sind.

Außerdem wurden die PDCA-1 Expression auf allen CD45 positiven Zellen dargestellt. Innerhalb des CD 45-positiven Leukozytenkompartiments der Leber exprimieren vorrangig große (hohes FSC), F4/80, MHC-II und CD 11b positive, CD 11c negative Zellen PDCA-1 (Abbildung 9 I und II). Hierbei handelt es sich um Kupferzellen, welche die Mehrheit der PDCA-1 positiven Zellen in der Leber der Maus auszumachen scheinen. Bei den übrigen PDCA-1 positiven Zellen handelt es sich wahrscheinlich um plasmazytoide dendritische Zellen und B-Zellen.

Mit PDCA-1 konnte also ein zweiter Marker gefunden werden, der weniger spezifisch für Kupferzellen ist als der verbreitete Marker F4/80 (der neben Kupferzellen lediglich die im steady state sehr spärlich in der Leber vorhandenen eosinophile Granulozyten markiert), aber weit spezifischer als die ebenfalls in der Fachliteratur als KC-Marker geführten Oberflächenmoleküle CD 11b, das außerdem auf Monozyten, Granulozyten und dendritischen Zellen exprimiert wird, CD 68, das alle Arten von Makrophagen markiert, oder Ly6C, das vor allem in der Diskriminierung verschiedener Monozytenpopulationen seine Stärke zeigt. Außerdem handelt es sich bei PDCA-1 um ein Markermolekül, das ebenso sensitiv auf Kupferzellen anspricht, wie der verbreitete Marker F4/80.

## 5.2. ESAM trennt KCs in zwei distinkte Gruppen

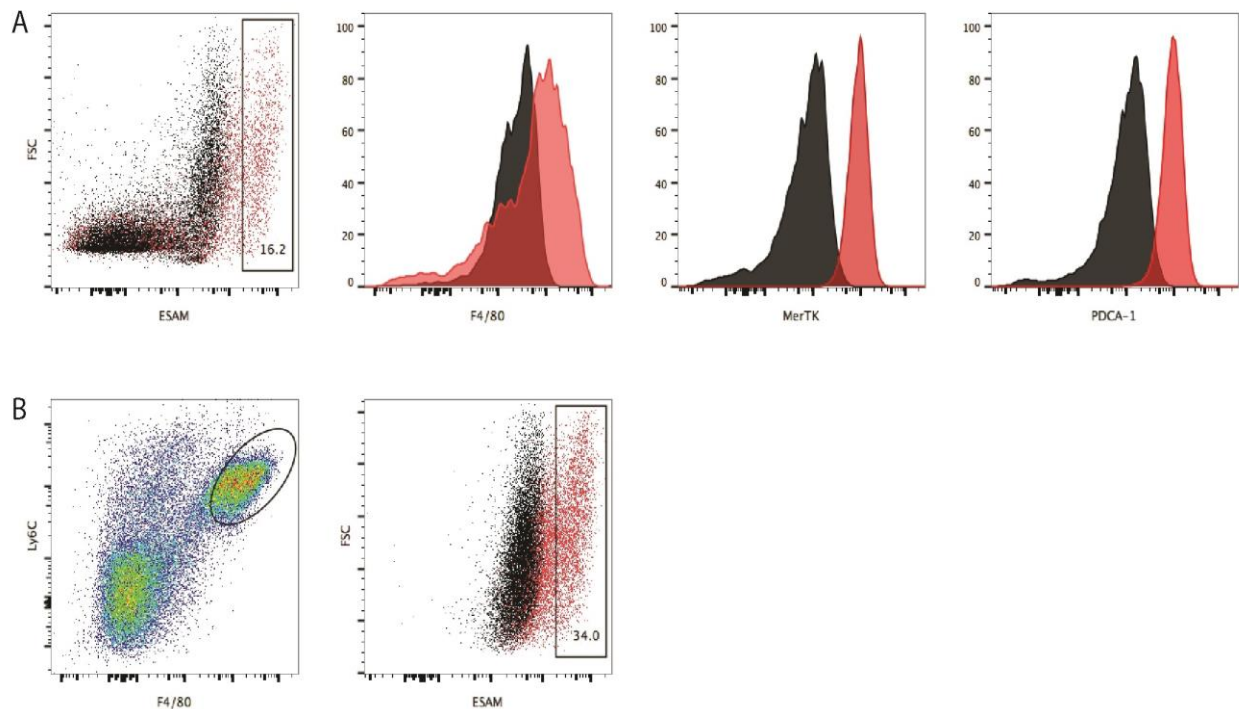


Abbildung 10: **A** ESAM-Expression innerhalb des CD 45 positiven Kompartiments der Leber. Von links: ESAM-Expression gegen Vorwärtsstreuung (FSC), F4/80, MerTK und PDCA-1. **B** ESAM-Expression innerhalb des Kupferzellkompartiments. Links: Identifikation der Kupferzellen, rechts: ESAM-Expression gegen Vorwärtsstreuung (FSC). In schwarz ist jeweils das Ergebnis der jeweiligen Isotypenkontrolle dargestellt, in rot das Ergebnis der spezifischen Färbung. Achsenbeschriftung der Dot plots in arbiträrer Einheit. Abszisse der Histogramme in arbiträrer Einheit. Ordinate der Histogramme in Prozent. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Hopp konnte in ihrer Masterarbeit zeigen, dass sich das Kupferzellkompartiment anhand der differentiellen Expression von CD 26 in zwei verschiedene Kompartimente trennen lässt (Hopp 2014, S.28). Bei CD 26 handelt es sich um einen anderen Namen für das Enzym Dipeptidylpeptidase 4, eine Protease, die in membrangebundener und sekretorischer Form vorliegen kann. Das Enzym erfüllt durch spezifische Hydrolyse von Peptidhormonen und Interaktion mit anderen Oberflächenproteinen verschiedene Funktionen in immunologischen, endokrinen und tumorbiologischen Prozessen (Gornell et al. 2001) und wird als Aktivitätsmarker von speziellen T-Lymphozyten betrachtet (Gorrell et al. 1991). CD 26 wird in der Leber außerdem von Hepatozyten und LSECs exprimiert (Fukui et al. 1990).

Die Präsenz von vaskulären Markern auf Kupfferzellen wird auch von anderer Seite behauptet (Okada et al. 2016), was die Frage aufwarf, in wiefern andere vaskuläre Marker ebenso dazu in der Lage sind, distinkte Kupfferzellpopulationen zu unterscheiden. Aus der Vielzahl der verwendeten endothelialen Marker fiel die Wahl auf das endothelspezifische Adhäsionsmolekül (ESAM), da dieses auch auf hämatopoietischen Stammzellen nachgewiesen werden konnte und so als ein vielversprechender Kandidat für die Expression auf Kupfferschen Zellen erschien. (Sudo et al. 2012).

Abbildung 10 zeigt, dass sich das Kupfferzellkompartiment durch ESAM in eine anfärbbare (ESAM positive) und eine nicht anfärbbare, (ESAM negative) Population unterteilen lässt. Während die ESAM positive Gruppe auch CD 26 exprimiert, zeigt die ESAM negative Population keine CD 26-Expression.

Ferner kann auf Grund der unterschiedlichen Vorwärtsstreuung im blauen Laser (FSC) eine unterschiedliche Größe der Zellen angenommen werden. So wird das Licht insbesondere in den Zellen stärker gestreut, die eine Expression vaskulärer Adhäsionsmoleküle an ihrer Oberfläche aufweisen. Das ist insbesondere vor dem Hintergrund interessant, dass ältere, elektronenmikroskopische Arbeiten bereits einen engeren Kontakt zwischen größeren, stärker verzweigten Kupfferzellen und LSECs darstellen konnten (Hardonk et al. 1989), was in diesem Kontext einen Zusammenhang zumindest nahelegt.

### 5.3. Die Expression von ESAM hängt nicht von der im Verdau eingesetzten Protease ab

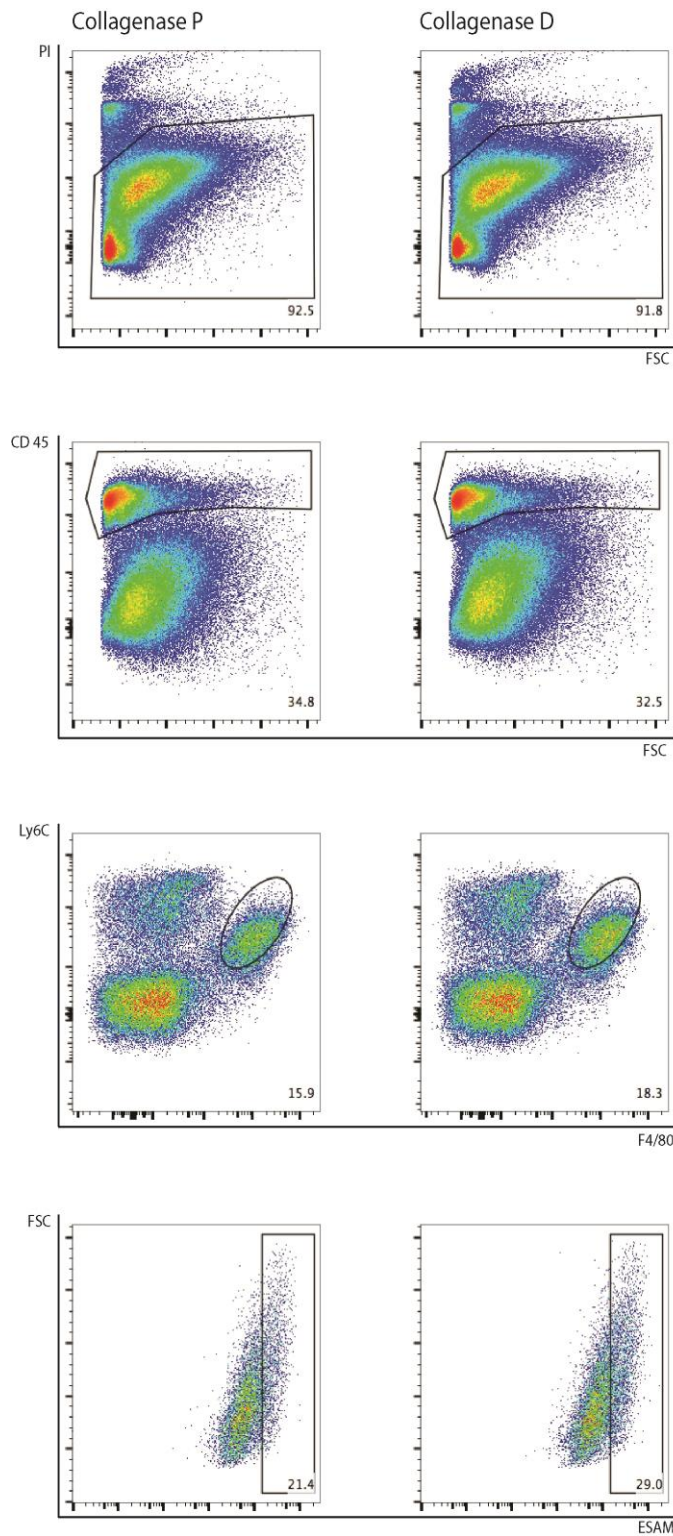


Abbildung 11 Einfluss der eingesetzten Protease auf die Anfärbarkeit der Leukozyten: **Linke Spalte** Zusammensetzung einer Einzelzellsuspension nach dem Verdau mit Collagenase P und Dispase, **Rechte Spalte** nach dem Verdau mit Collagenase D. Achsenbeschriftung der Dot plots in arbiträrer Einheit. Abszisse der Histogramme in arbiträrer Einheit. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Bei der Herstellung von Einzelzellsuspensionen kommt zur enzymatischen Lyse der Matrix ein Verdauerpuffer zum Einsatz, der Proteasen enthält. Diese spalten spezifische Strukturen von Matrixproteinen, allerdings können auch Oberflächenproteine der enzymatischen Hydrolyse unterworfen sein, was eine mangelhafte Anfärbbarkeit dieser Strukturen in Folgeexperimenten bedingt. Um zu klären, ob es sich bei der kleineren, ESAM negativen, Kupferzellpopulation um ein Präparationsartefakt durch die eingesetzte Protease (Collagenase P, Dispase) handelt, wurde der Verdau mit einer anderen Protease als Ersatz im Verdauerpuffer wiederholt (Collagenase D). Abbildung 11 zeigt eine repräsentative Gegenüberstellung der Versuchsergebnisse. Zur Darstellung gelangt, dass die Vitalität der finalen Einzelzellsuspension, hier mittels PI dargestellt, sich nicht zwischen den beiden Verdauerpufferansätzen unterscheidet. Darüber hinaus scheint auch die Verteilung der Oberflächenmoleküle, die in den weiteren Experimenten betrachtet werden, nicht signifikant verschieden zu sein. Auch bei der Verteilung der großen, ESAM positiven Kupferzellen zu den kleinen, ESAM negativen Kupferzellen gibt es keinen relevanten Unterschied, der über die Präparationstechnisch bedingte Verschiedenheit der Anteile von Subpopulationen in der Einzelzellsuspension hinaus geht.

## 5.4. PDCA-1 und ESAM-Expression in anderen Organen

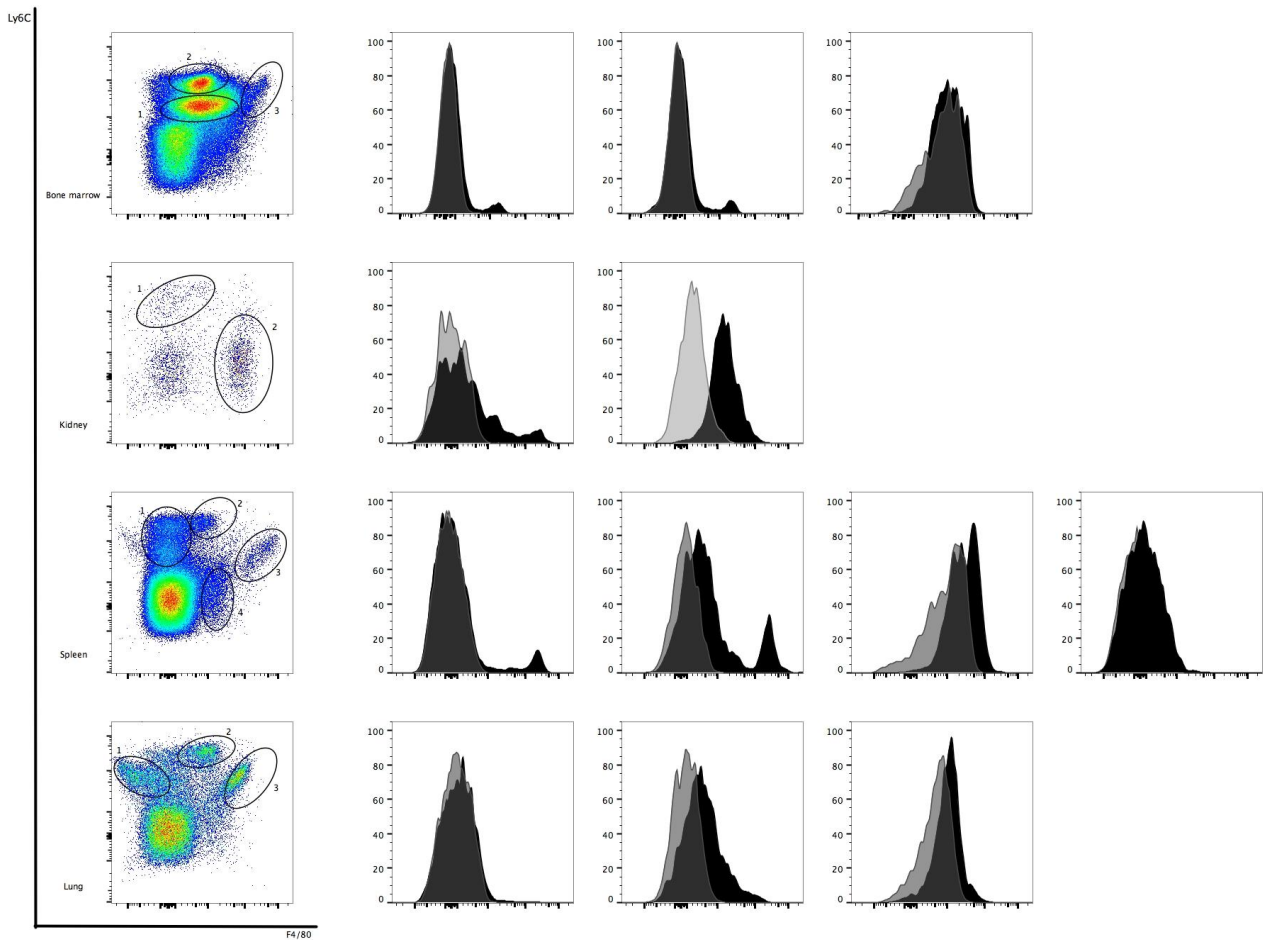


Abbildung 12: Expression von PDCA-1 in Knochenmark, Niere, Milz und Lunge. **Linke Spalte:** Festlegung der Analysegruppen anhand der Expression von F4/80 und Ly6C. **Weitere Spalten:** In jeder Zeile sind die Populationen in numerischer Reihenfolge von links nach rechts aufgetragen. In grau ist jeweils das Ergebnis der jeweiligen Isotypenkontrolle dargestellt, in schwarz das Ergebnis der spezifischen Färbung. Achsenbeschriftung der Dot plots in arbiträrer Einheit. Abszisse der Histogramme in arbiträrer Einheit. Ordinate der Histogramme in Prozent. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Die Erkenntnis, dass PDCA-1 in der Leber eine sinnvolle Ergänzung des Markerkollektivs zur durchflusszytometrischen Darstellung von Makrophagen darstellt, legte nahe, auch in anderen Organen die Expression von PDCA-1 in verschiedenen Makrophagenpopulationen zu untersuchen. Hierzu wurden neben den immunologischen Organen Milz und Knochenmark auch Nieren und Lungen untersucht, da diese Organe mit den Alveolarmakrophagen und den renalen Makrophagen zwei große organresidente Makrophagenpopulationen aufweisen und, ähnlich der Leber, beide über eine hohe

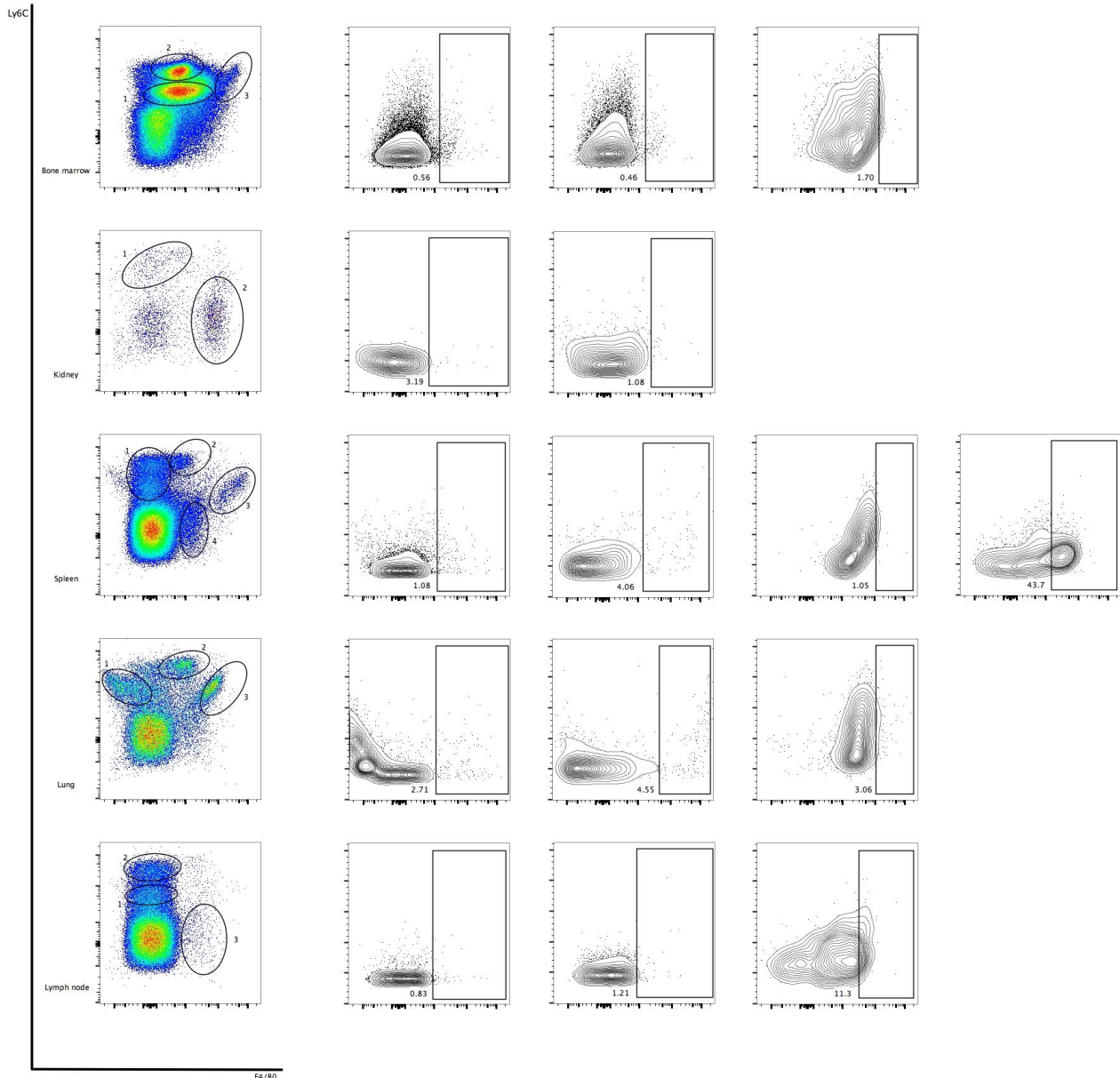


Abbildung 13: **Linke Zeile:** Festlegung der Analsegruppen für weitere Analysen analog zu Abb. 12. **Weitere Zeilen:** ESAM-Expression in den isolierten Populationen in numerischer Reihenfolge, dargestellt gegen Vorwärtsstreuung (FSC). Darstellung als Zebra Plot. Boxen markieren Expression stärker als der Isotyp. Achsenbeschriftung der Dot plots und Zebra plots in arbiträrer Einheit. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Organperfusion verfügen.

Abb. 12 zeigt die Expression von PDCA-1 in verschiedenen CD 45-positiven Gruppen, die anhand ihrer Expression der myeloischen Markermoleküle Ly6C und F4/80 aufgetrennt wurden. Interessanterweise findet sich in allen untersuchten Organen eine Expression von PDCA-1 auf Zellen, die keine plasmazytoiden dendritischen Zellen darstellen (F4/80



positiv). Im Makrophagenkompartiment fällt die Expression von PDCA-1 allerdings in jedem Fall mit der Expression von F4/80 zusammen. Außerdem sind nicht alle F4/80 positiven Zellen auch PDCA-1 positiv, sodass die große Trennschärfe, die in der Leber unter Zuhilfenahme von PDCA-1 erreicht werden konnte, in den betrachteten Organen nicht zur Anwendung kommen kann.

Auch die Expression von ESAM als Stellvertreter für endotheliale Marker wurde in den beschriebenen Organen untersucht (Abb. 13). Hier zeigt sich, dass lediglich in der Milz der untersuchten Tiere eine Subpopulation F4/80 positiver Makrophagen, bei der es sich um Makrophagen der roten Pulpa handelt (Gordon et al. 2014), in eine ESAM positive und eine ESAM negative Population aufspaltbar sind. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund interessant, als diese Makrophagen der roten Pulpa Kupfferschen Zellen nicht nur morphologisch ähneln, sondern ebenso wie diese direkten Kontakt zum Blutstrom haben und ihnen in distinkten Funktionen sehr ähnlich sind. Sie zeigen als Reaktion auf inflammatorische Stimuli ein ähnliches Sekretionsprofil im Hinblick auf Prostaglandine und Leukotriene und zeigen ebenso wie Kupffersche Zellen einen fehlenden „oxidative burst“ als Reaktion auf die Phagozytose von grampositiven Bakterien (Nusrat et al. 1988).

## 5.5. Expressionsprofile von ESAM pos. und ESAM neg. Kcs

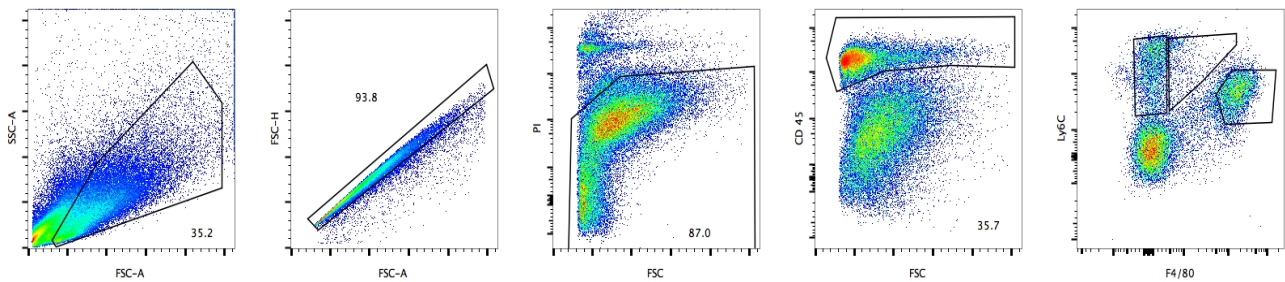


Abbildung 14 Gatingstrategie bei der Phänotypisierung der myeloischen Populationen. Nach einer Exklusion von zellulärem Debris, Doubletten und toten Zellen (mit Propidiumiodid) wurde zunächst die CD45 positive Population ausgewählt, diese wurde in vier Populationen aufgeteilt: Population 1 umfasst vorwiegend Monozyten (F4/80neg. Ly6C kräftig), Population 2 umfasst Makrophagen monozytären Ursprungs (Ly6C kräftig, F4/80 schwach) und Population 3 Kupfferzellen sensu strictu (F4/80 kräftig, Ly6C schwach). Die vierte Population (doppelt negativ) wurde für die weiteren Analysen nicht berücksichtigt. Achsenbeschriftung der Dot plots in arbiträrer Einheit. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Zur Darstellung der Expression von endothelialen und makrophagenassoziierten intrazellulären und membrangebundenen Markern wurden die CD45 positiven Zellen von gesunden Mäuselebern durchflusszytometrisch anhand der differentiellen Expression von Ly6C und F4/80 in vier Gruppen eingeteilt. Ly6C positive, F4/80 negative Monozyten (Population 1 in Abb. 14), Ly6C positive, F4/80 schwach exprimierende Makrophagen monozytären Ursprungs (Population 2 in Abb. 14) sowie F4/80 stark positive, Ly6C schwach exprimierende Kupfferzellen (Population 3 in Abb.14) und doppelt negative Zellen (nicht dargestellt in Abb.14).

Die zellgruppenspezifische Untersuchung der Expression von makrophagenassoziierten Oberflächenmolekülen zeigt, dass beide anhand der ESAM-Expression getrennten Kupfferzellpopulationen die vom Immune Genome-Konsortium als typisch für organresidente Makrophagen beschriebene Markerkonstellation zeigen.

Beide sind positiv für die Tyrosinkinase MerTK und für den IgG-Rezeptor CD64. Interessanterweise zeigen ESAM positive KCs eine kräftigere Expression von MerTK als ESAM negative bei gleichstarker Expression anderer Makrophagenmarker. Unlängst wurde gezeigt, dass kräftig MerTK-exprimierende Makrophagen eine Rolle bei der Restoration akuter Leberschäden spielen (Triantafyllou et al. 2017).

Die Expression von MerTK wird durch Fragmente apoptotischer Zellen stimuliert und spielt eine Rolle bei der Degradation von zellulärem Debris, wobei die MerTK-assoziierte

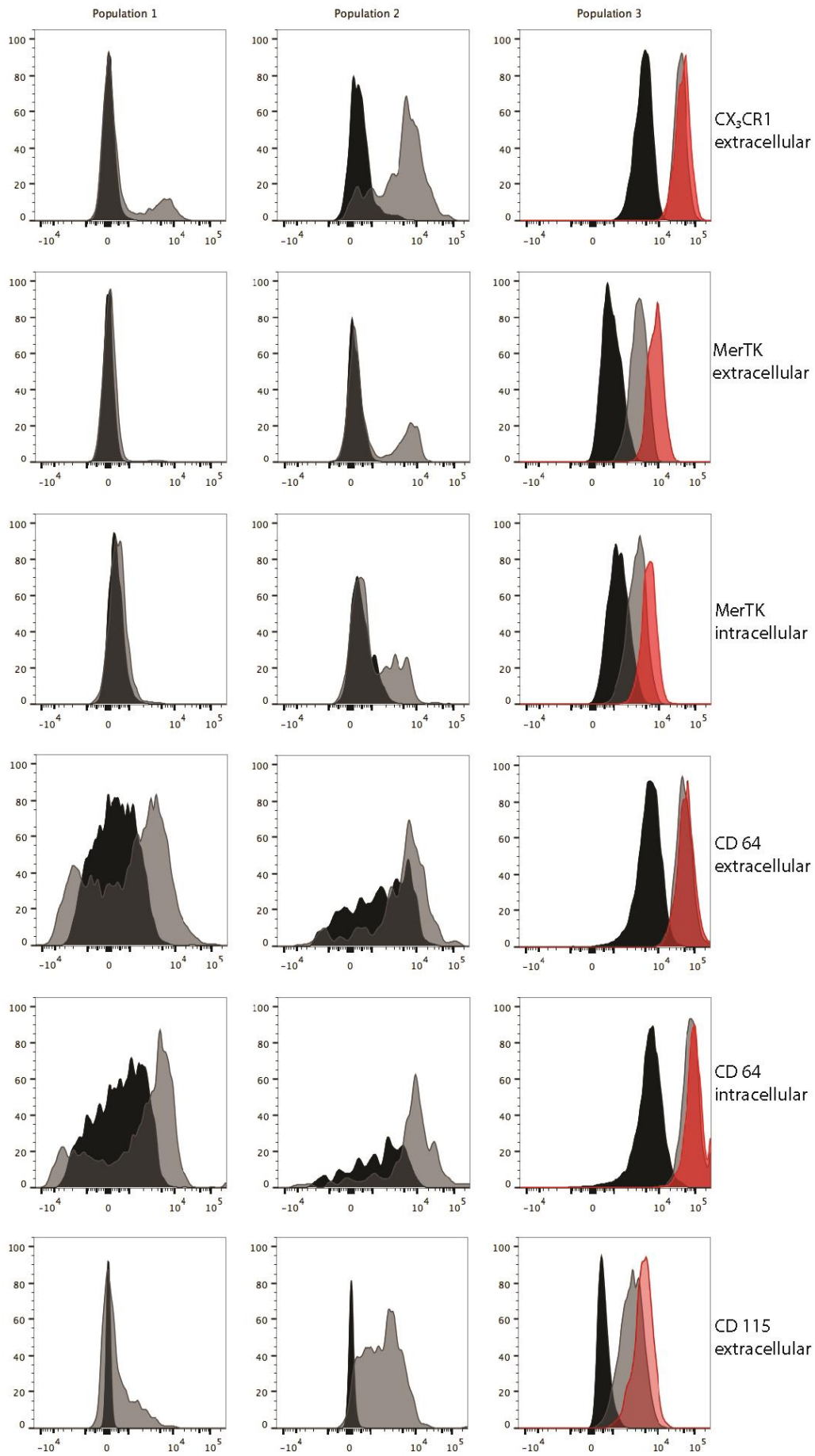


Abbildung 15 Darstellung der Expression Makrophagen-assoziiierter Molekülen auf den Populationen aus

Abb. 14. **Linke Spalte:** Population 1. **Mittlere Spalte:** Population 2. **Rechte Spalte:** Population 3. In Schwarz ist die unspezifische Isotypenkontrolle dargestellt. Grau zeigt die spezifische Färbung, in Population 3 in den ESAM negativen Zellen. In rot ist die spezifische Färbung in den ESAM positiven Zellen dargestellt. Die Ordinate zeigt den Anteil der betrachteten Zellen in Prozent, die Abszisse die Signalintensität in einer arbiträren Einheit. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Signalkaskade vor allem mit antiinflammatorischen Reaktionen und hoher phagozytischer Aktivität der exprimierenden Makrophagen in Verbindung gebracht wird (Mukherjee et al. 2016, Trahtenberg et al. 2017). Die vorliegenden Daten zeigen allerdings auch, dass MerTK nicht spezifisch auf Kupfferschen Zellen exprimiert wird, sondern dass es auch zumindest von einer Teilgruppe von Makrophagen monozytären Ursprungs exprimiert wird.

Bei CX<sub>3</sub>CR1 handelt es sich um den Rezeptor für das Signalmolekül Fractalkine (auch CX<sub>3</sub>CL1). Der damit verbundene Signalweg ist an der Migration und der phagozytischen Aktivität verschiedener Leukozyten beteiligt. *Karlmark et al.* konnten zeigen, dass CX<sub>3</sub>CR1-defiziente Mäuse eine vermehrte Fibrose als Antwort auf chronische Leberentzündungen zeigen. Sie erklären diesen Effekt unter anderem mit der Rolle, die der Rezeptor bei der Differenzierung proinflammatorischer Monozyten zu eher antiinflammatorischen Makrophagen und deren Überlebensdauer im Gewebe spielt (Karlmark et al. 2010). Intestinale CX<sub>3</sub>CR1 exprimierende Makrophagen zeigen eine hohe phagozytische Aktivität und sind an der Initiierung innater entzündlicher Antworten auf intestinale Mikroben beteiligt und spielen so eine Rolle bei der Regulation der transepithelialen Migration intestinaler Mikroorganismen (Regoli et al. 2017). Der Marker wurde insbesondere auf eine unterschiedliche Expression zwischen ESAM positiven und ESAM negativen Kupfferzellen untersucht, da eine differentielle Expression eventuell einen Hinweis auf verschiedene funktionelle Eigenschaften der beiden Kupfferzellpopulationen gegeben hätte. Allerdings ist CX<sub>3</sub>CR1 in gleicher, niedriger Intensität auf der Oberfläche beider Populationen nachzuweisen. Wie der Literatur zu entnehmen ist, sind Makrophagen monozytären Ursprungs nahezu vollständig positiv für CX<sub>3</sub>CR1, innerhalb der Monozytenpopulation zeigt nur eine kleine Gruppe eine Expression des Rezeptors.

Da mit ESAM und CD 26 zwei typischerweise auf Endothel exprimierte Moleküle die Kupfferzellpopulation trennen, wurden in der Folge andere populäre endotheliale Marker auf eine differentielle Expression untersucht (Abb. 16).

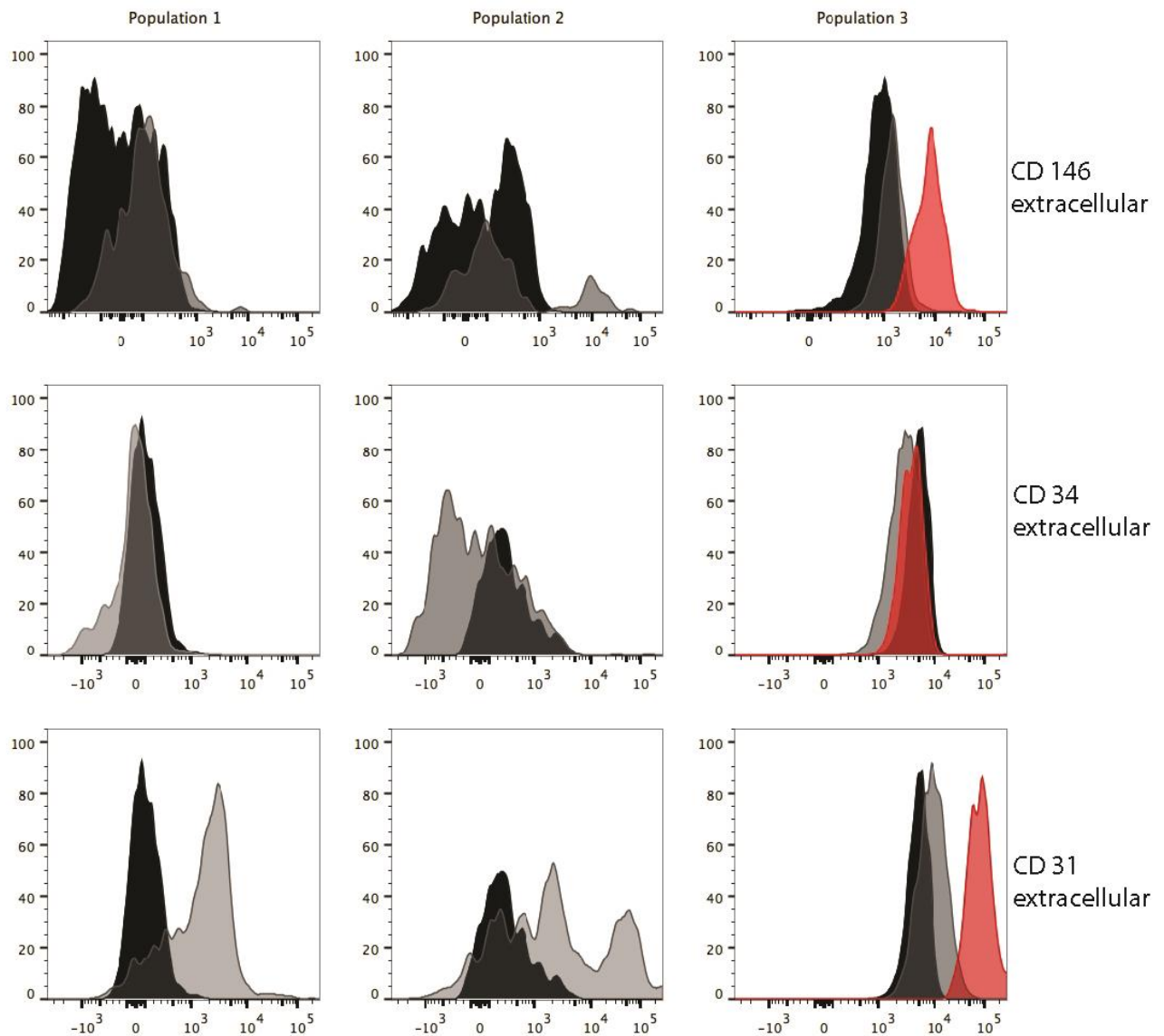


Abbildung 16: Darstellung der Expression Endothel-assoziiierter Moleküle auf den Populationen aus Abb. 14. **Linke Spalte:** Population 1. **Mittlere Spalte:** Population 2. **Rechte Spalte:** Population 3. In Schwarz ist die unspezifische Isotypenkontrolle dargestellt. Grau zeigt die spezifische Färbung, in Population 3 in den ESAM negativen Zellen. In rot ist die spezifische Färbung in den ESAM positiven Zellen dargestellt. Die Ordinate zeigt den Anteil der betrachteten Zellen in Prozent, die Abszisse die Signalintensität in einer arbiträren Einheit. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Interessanterweise konnte dabei beobachtet werden, dass ESAM positive Kupferzellen ebenso die endothelialen Marker CD 146 und CD 31 exprimieren. Der außerdem mit hämatopoetischen Stammzellen in Verbindung gebrachte endotheliale Marker CD 34 konnte allerdings nicht auf der Oberfläche gleich welchen Kupferzell-Subtyps nachgewiesen werden.

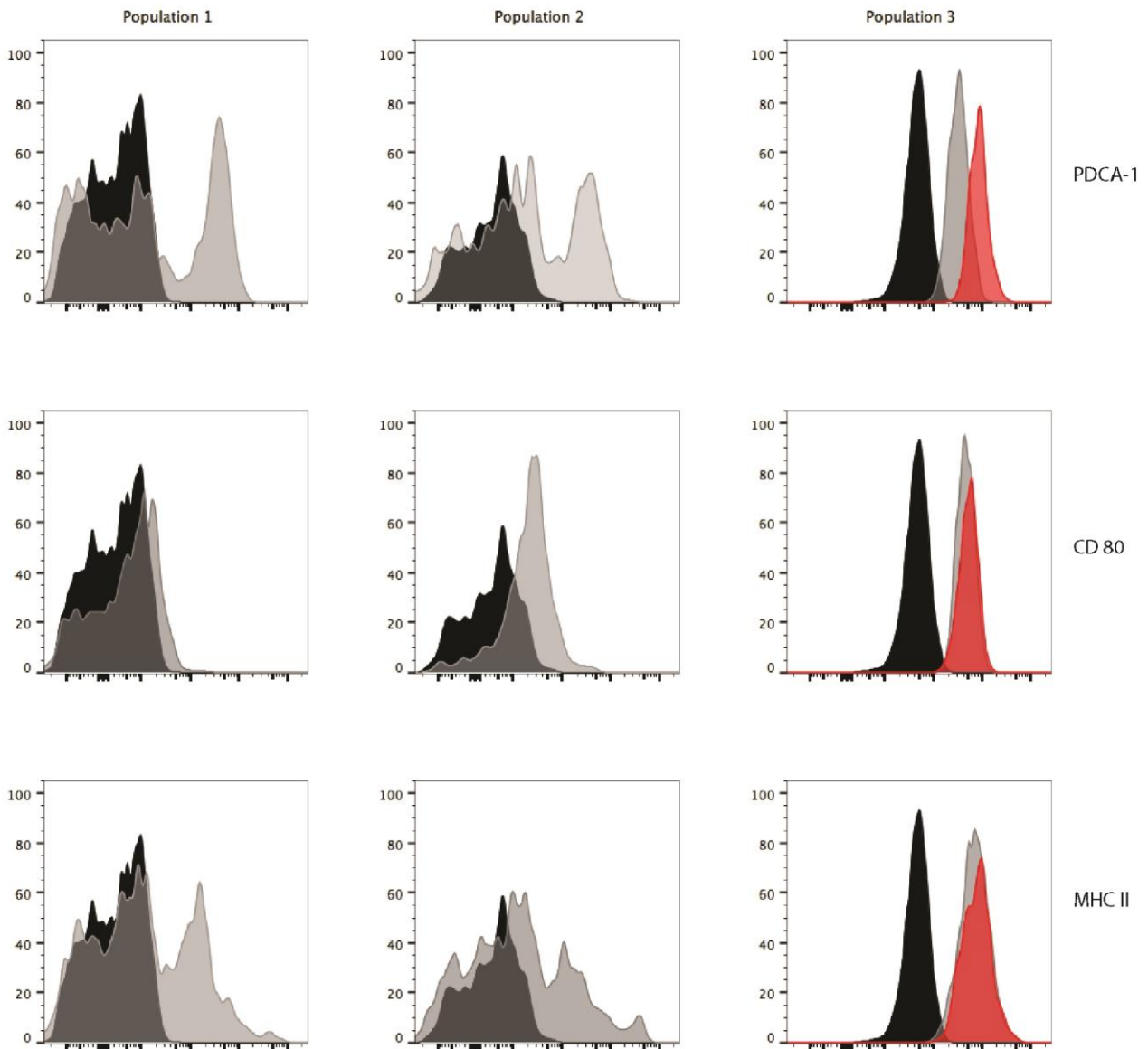


Abbildung 17: Darstellung von Aktivitätsmarkern auf den Populationen aus Abb. 5. **Linke Spalte:** Population 1. **Mittlere Spalte:** Population 2. **Rechte Spalte:** Population 3. In Schwarz ist die unspezifische Isotypenkontrolle dargestellt. Grau zeigt die spezifische Färbung, in Population 3 in den ESAM negativen Zellen. In rot ist die spezifische Färbung in den ESAM positiven Zellen dargestellt. Die Ordinate zeigt den Anteil der betrachteten Zellen in Prozent, die Abszisse die Signalintensität in einer arbiträren Einheit. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Bei ESAM, CD 31 (PeCAM) und CD 146 (MCAM) handelt es sich um zelluläre Adhensionsmoleküle die für die Verbindung von Endothelzellen untereinander ebenso verantwortlich sind, wie für die Interaktion von Leukozyten und Endothelzellen bei der Leukozytenextravasation in entzündete Gewebe. (Hossaim et al. 2015, Harkness et al. 2016, Muller 2011).

Die zusammenhängende Expression von Molekülen, die mit erhöhter Phagozytoserate assoziiert sind und Molekülen, die die Extravasation und Migration von Leukozyten im Gewebe vermitteln, lässt die Frage aufkommen, ob es sich bei den beobachteten Konstellationen um unterschiedliche Aktivierungszustände Kupfferscher Zellen handelt. Obwohl elektronenmikroskopische Studien das Vorhandensein von unterschiedlich großen, unterschiedlich stark gefalteten Kupfferzellen in den Lebern gesunder Ratten nachweisen konnten (Bouwens et al. 1986), ist bis heute kein molekularer Phänotyp für aktivierte Kupfferzellen beschrieben worden.

In einem nächsten Schritt wurde die Expression von Molekülen untersucht, die mit der Aktivierung von Makrophagen assoziiert werden. Da die phagozytotische Aktivität und sekretorische Aktivität nur in in-vitro-Assays aussagekräftig evaluiert werden können, wurde zunächst die Expression der an der Antigenpräsentation beteiligten Moleküle MHC-II und CD 80 untersucht (vgl. Abb. 17). Diese werden von ESAM positiven und ESAM negativen Kupfferzellen in gleicher Intensität exprimiert.

Interessanterweise unterscheidet sich die Expression von PDCA-1, einem Marker der ursprünglich mit der Aktivität plasmazytoider Dendritischer Zellen und spezieller B-Zellen in Verbindung gebracht wurde, zwischen den Populationen. So zeigen ESAM positive Zellen eine stärkere Expression von PDCA-1 als ESAM negative.

In der Zusammenschau der Befunde zeigt sich eine stärkere Expression von phagozytoseassoziierten Molekülen und solchen, die den Zell-Zell-Kontakt medieren auf ESAM positiven Kupfferzellen. Moleküle, die mit der Antigenpräsentation assoziiert sind werden hingegen nicht verstärkt auf ESAM positiven Kupfferzellen exprimiert. Dies lässt zunächst den Verdacht aufkommen, bei ESAM positiven Kupfferzellen könne es sich um die aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Leber bekannten „großen“ Kupfferzellen handeln, die mit vielen Filopodien den Lebersinus durchspannen und eine hohe phagozytische Aktivität aufweisen. (Bouwens et al. 1986). Diese Zellen sind insbesondere Lappchenzentral lokalisiert und verfügen neben der hohen phagozytischen Aktivität wohl auch über eine Funktion bei der Regulation des Blutflusses der Leber, indem sie über Adhäsionsmoleküle an der Oberfläche transiente Kontakte sowohl zu LSECs als

auch zu neutrophilen Granulozyten ausbilden und so die Strömungsfläche der Lebersinus regulieren. (Vonnahme 1993, S.40f)

Da aber die alleinige Expression entsprechender Oberflächenmoleküle keine tatsächliche funktionelle Aussage möglich macht, wurde in einem nächsten Schritt versucht, die beiden Populationen in adäquater Reinheit zu isolieren, um im Rahmen von in-vitro-Experimenten die aus dem molekularen Phänotyp abgeleiteten Vermutungen zu überprüfen.

## 5.6. Unterschiedliche Strahlensensibilität der beiden Populationen

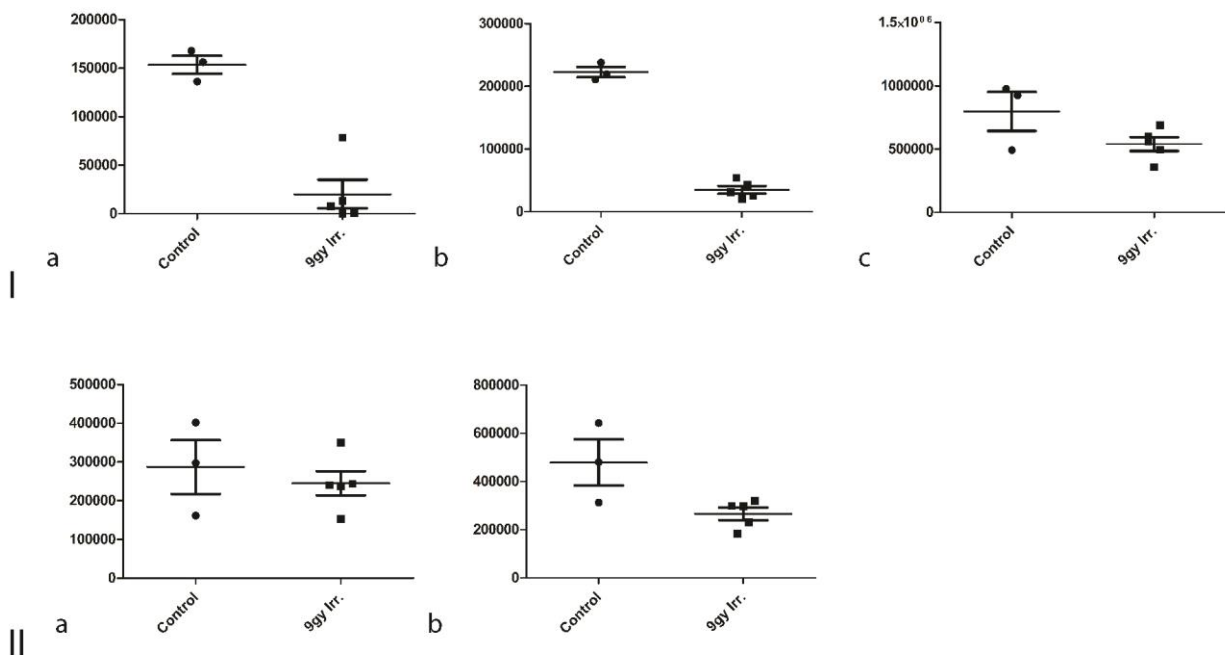


Abbildung 18: **I** Numerisches Verhalten der in Abb. 14 definierten Zelltypen drei Tage nach einmaliger Bestrahlung mit 9 gy. **(a)** Ly6C kräftig exprimierende, F4/80 negative Monozyten **(b)** Ly6C positive, F4/80 schwach exprimierende monozytäre Makrophagen **(c)** Kupferzellen. **II** Numerisches Verhalten der unterschiedlichen Kupferzellpopulationen. **(a)** ESAM positive **(b)** ESAM negative. Dargestellt ist jeweils das arithmetische Mittel (lange Linie) und das Konfidenzintervall (kurze Linien). Die Ordinate zeigt die absolute Zahl der entsprechenden Zellgruppe an. Auf der Abszisse sind die jeweiligen Behandlungsgruppen eingetragen. Statistische Untersuchungen konnten aufgrund der kleinen Gruppengröße nicht vorgenommen werden.

Klein und Kollegen zeigen in Ihrer Arbeit, dass in der Leber eine strahlensensible und eine strahlenresistente Population von Makrophagen parallel zueinander existieren. (Klein et al. 2007). Die Autoren zeigen, dass insbesondere „sessile“ Makrophagen, die Kupferzellen sensu strictu darstellen, wenig auf die Behandlung der Versuchstiere mit ionisierender Strahlung reagieren, während Makrophagen hämatopoietischen Ursprungs sensibel auf



diese Noxe reagieren.

Um zu prüfen, ob die beschriebene Strahlenresistenz, die häufig als Kerneigenschaft der Makrophagen embryonalen Ursprungs erwähnt wird. (Soysa et al. 2016) der leberresidenten Makrophagen in ESAM positiven wie ESAM negativen Kupfferzellen gleichermaßen ausgeprägt ist oder ob die Behandlung mittels ionisierender Strahlung vielleicht eine Möglichkeit der Anreicherung darstellt, wurden Versuchsmäuse wie zuvor beschrieben einer sublethalen Bestrahlung unterzogen. Die Ergebnisse der Bestrahlungsexperimente (Abb. 18) zeigen, dass im Vergleich zu Monozyten (Ia) und Makrophagen monozytären Ursprungs (Ib), die Gesamtzahl der Kupfferschen Zellen (Ic) tatsächlich nur eine geringe Veränderung erfährt, tendenziell aber auch leicht abnimmt. Diese diskrete Abnahme ist nahezu ausschließlich auf eine Abnahme des ESAM negativen Kompartiments zurückzuführen (IIa), während die ESAM positive Gruppe in ihrer Gesamtzahl weitestgehend konstant bleibt (IIb).

Diese Ergebnisse unterstreichen, dass es sich bei beiden Populationen weitestgehend um „echte“ Kupfferzellen im Sinne organresidenter Makrophagen handelt. Interessanterweise scheint insbesondere die Population der ESAM negativen Zellen eine im Vergleich zur ESAM positiven Gruppe eine erhöhte Strahsensibilität aufzuweisen, was eventuell auf eine erhöhte proliferative Aktivität in diesem Kompartiment hindeuten kann. Diese Beobachtung kann aber auch darauf hinweisen, dass sich in dieser Subpopulation auch knochenmarkabhängige Makrophagen aufhalten, die von strahlensensiblen Vorläuferzellen abstammen. In jedem Fall zeigte sich der Effekt als zu schwach, um als Anreicherunshilfe in weiteren Experimenten zu dienen.

## **5.7. Kongene Knochenmarkstransplantation**

Eine weitere in der Literatur beschriebene Eigenschaft von Kupfferzellen ist die Unabhängigkeit von knochenmarkständigen Vorläuferzellen im adulten, gesunden Tier (Hashimoto et al. 2013, Sieweke et al. 2013, Yona et al. 2013). Aus diesem Grund wurden Mäuse einer kongenen Knochenmarkstransplantation unterzogen, wobei die Empfängermäuse entweder homozygot für das Allel CD 45.1 oder CD 45.2 ausgewählt wurden, während die Spendermäuse homozygote Träger des Allels CD 45.1 waren. Eine Woche nach der Transplantation zeigten sich, wie erwartet, alle Monozyten und

Makrophagen monozytären Ursprungs CD 45.1 positiv. Interessanterweise exprimierten in den dargestellten Experimenten auch alle Kupferzellen CD 45.1 auf ihrer Oberfläche, was auf eine Abstammung von knochenmarkständigen Vorläuferzellen hinweist. (Abb.19). Dies steht scheinbar im Widerspruch zur gängigen Auffassung, Kupferzellen seien eine gänzlich von knochenmarkabstammenden Zellen unabhängige Population.

Diese Darstellung entstammt allerdings vor allem Studien, bei denen genetisch alterierte

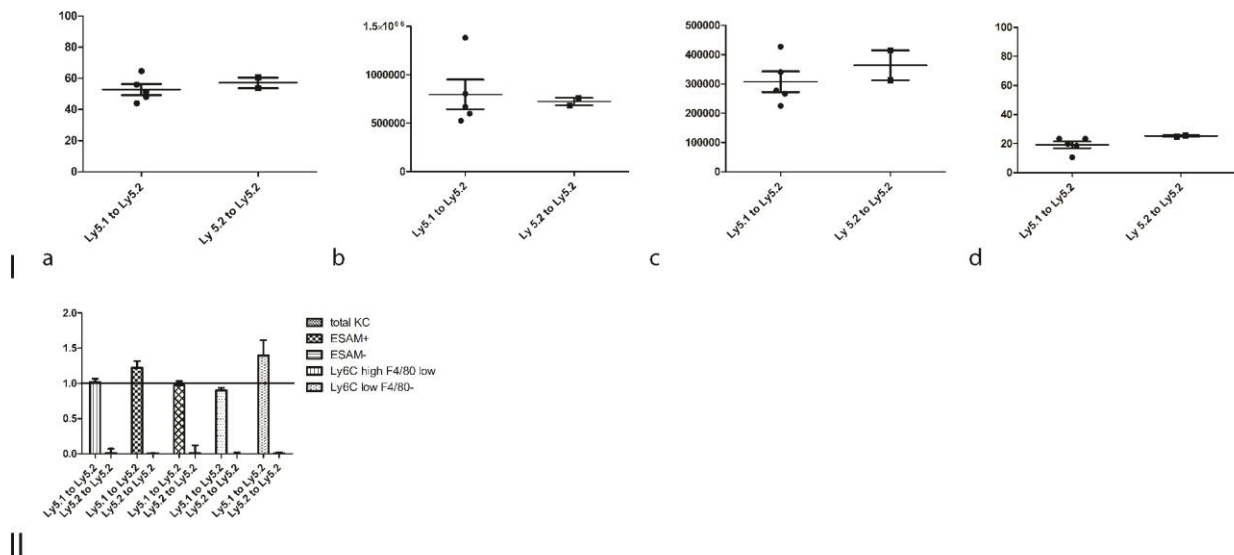


Abbildung 19: Knochenmarkstransfer kongener Mäuse. I: (a) CD 45 positive Zellen (b) Kupferzellen (c) Monozyten (d) Anteil ESAM positiver Zellen an Gesamtkupferzellen Auf der Abszisse ist die Behandlung aufgetragen. Die Ordinate zeigt die Zahl der Zellen in absoluten Zahlen an. Dargestellt ist das arithmetische Mittel aller Versuchstiere (lange Linie) und das Konfidenzintervall (kurze Linien) II: Anteil Ly5.1 positiver Zellen an der Gesamtpopulation. Die Abszisse zeigt die jeweilige Zellpopulation. Die Ordinate den Anteil der Ly5.1 positiven Zellen an der Gesamtpopulation. Dargestellt ist das arithmetische Mittel aller Versuchstiere (Balken) und das Konfidenzintervall (kurze Linien). Auf statistische Berechnungen wurde auf Grund der kleinen Gruppengröße verzichtet.

Mäuse zum Einsatz kamen, welche Marker für hämatopoietische Vorläuferzellen exprimieren (Gomez Perdiguero und Klapproth et al. 2015). In diesen Studien werden ferner nur Mäuse untersucht, bei denen kein Krankheitszustand künstlich induziert wurde. Bei den verwendeten sublethalen, perkutan applizierten Strahlendosen ist jedoch das Vorliegen eines strahleninduzierten hepatischen Parenchymschadens nicht auszuschließen. In diesem Fall ist eine Alteration der Zellularität der Leber anzunehmen, was einen ein Influx von Monozyten in das phänotypisch definierte

Kupferzellkompartiment denkbar erscheinen lässt (Blériot et al. 2014).

## 5.8. Isolationsversuche mittels MACS

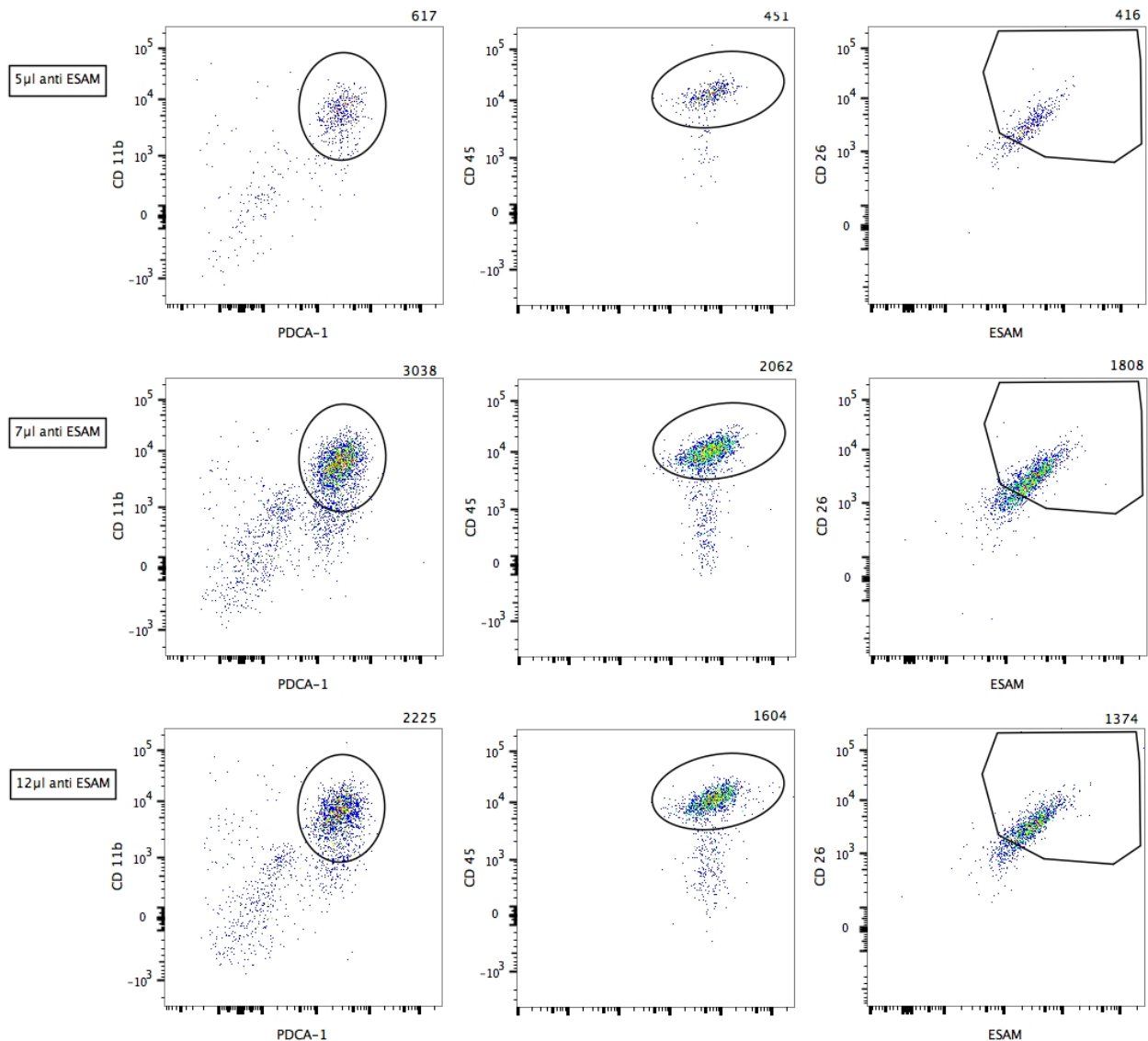


Abbildung 20 Reinheitskontrolle der positiven Fraktion nach MACS. Jede Zeile stellt eine Bead-Konzentration dar. Achsen repräsentieren Signalintensitäten in arbiträrer Einheit. Zahl oben rechts stellt die absoluten Events pro Gate dar. Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

In einem ersten Schritt wurde versucht, Kupferzellen unter Zuhilfenahme der MACS-Methode zu isolieren. Hierbei wurden Kupferzellen mit Antikörpern gegen F4/80 inkubiert,

welche mit kleinen Eisenkugeln verknüpft worden sind. Eine anschließende Passage durch einen Magneten erlaubt eine Auftrennung in eine positive und eine negative Population. Nach einem intensiven Waschgang mit MACS-Puffer (Miltenyi) wurden die Zellen mit FITC-markierten Antikörpern in variabler Dosis gegen ESAM inkubiert und einer erneuten magnetgestützten Sortierung unterzogen (Abbildungen 20+21).

Hierbei gelang zwar eine gute Aufreinigung der ESAM-positiven

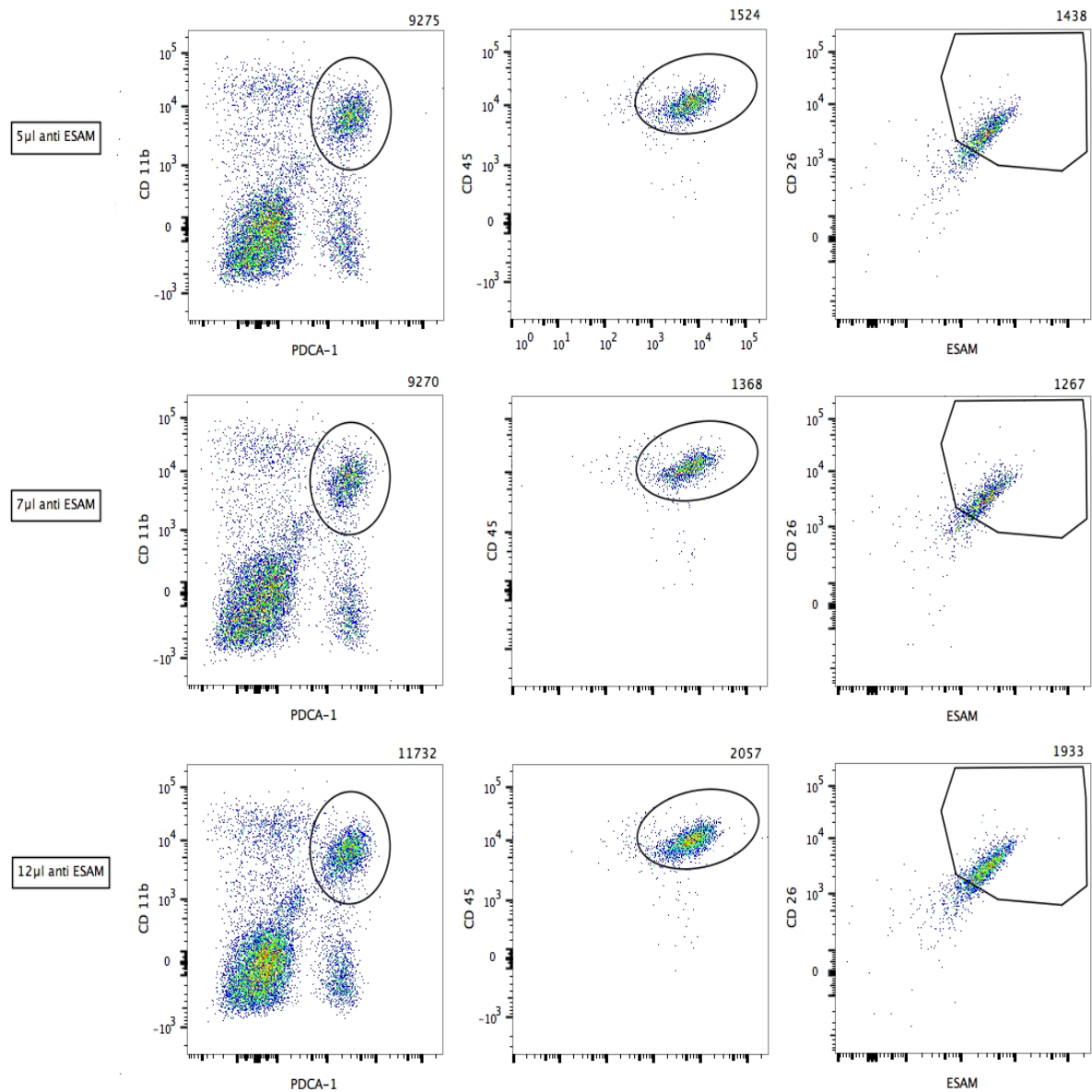


Abbildung 21: Reinheitskontrolle der positiven Fraktion nach MACS. Jede Zeile stellt eine Bead-Konzentration dar. Achsen repräsentieren Signalintensitäten in arbiträrer Einheit. Zahl oben rechts stellt die absoluten Events pro Gate dar. Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente

Kupferzellpopulation, bei jedoch sehr kleiner numerischer Ausbeute und nicht suffizienter Reinheit. Aus diesem Grund wurde langfrisig auf die Durchführung magnetgestützter Sortierungen verzichtet.

## 5.9. Versuch der Vereinzelung der Populationen durch Kultur

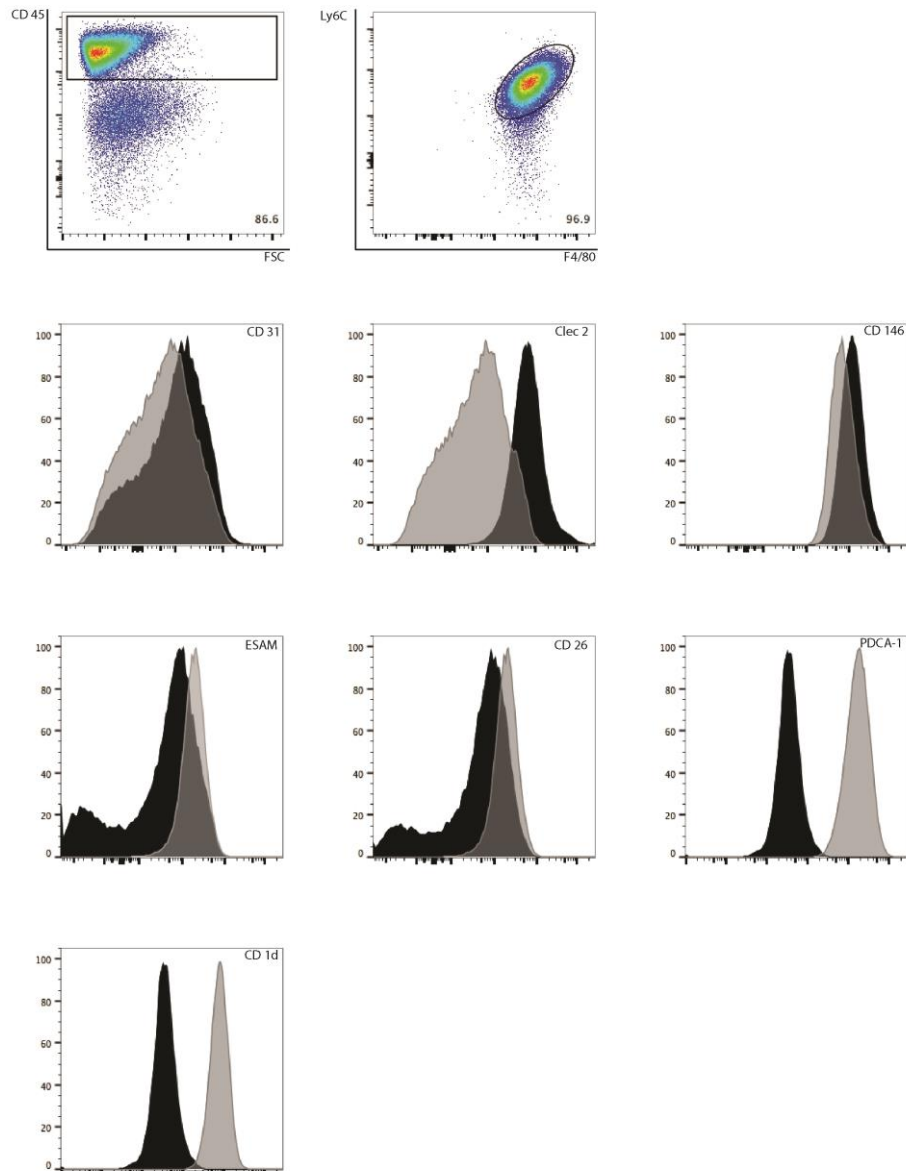


Abbildung 4: **Erste Zeile:** Gating der Makrophagen in der Primärkultur: **Histogramme:** In schwarz ist der unspezifische Isotyp dargestellt. Grau zeigt die spezifische Färbung. Achsenbeschriftung der Dot plots in arbiträrer Einheit. Abszisse der Histogramme in arbiträrer Einheit. Ordinate der Histogramme in Prozent. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

In Leberprimärkulturen auf mit Kollagen Ia beschichteten Kulturschalen stellen Makrophagen mit Kupfferzellphänotyp nach zehn Tagen die Majorität der Zellen (vergl. Abb. 22, erste Zeile). Da die auf technische Hilfsmittel gestützte Isolation von ESAM positiven Kupfferzellen direkt aus dem Leberlysat nicht zufriedenstellend gelang, wurde in

einem nächsten Schritt versucht, durch selektive Anzucht das entsprechend differenzierte Kupferzellkompartiment anzureichern.

Abbildung 22 zeigt, dass die Primärkultur der Leber nach zehn Tagen zu 80-90% aus Leukozyten mit Kupferzellphänotyp besteht (F4/80 positiv, Ly6C schwach). Diese sind allerdings anders als die in vivo dargestellten Kupferzellen nicht durch ESAM, CD26, CD146 oder CD 31 in zwei Populationen trennbar.

Beim Vergleich des FSC der kultivierten Leukozyten mit den Leukozyten des Leberlysats fällt ins Auge, dass insbesondere die größte Population der Leukozyten, welche besonders aus ESAM positiven Kupferzellen besteht, nicht in der Kultur vorhanden ist.

Aufgrund der Arbeitshypothese, es handele sich bei ESAM positiven Kupferzellen um aktivierte Kupferzellen, wurde versucht, Kupferzellen in vitro in einen aktivierten Zustand zu versetzen. Hierzu wurde dem Kulturmedium in den letzten drei Tagen vor der Ernte entweder LPS oder Poly(I:C) zugesetzt. Die beiden Substanzen sind Agonisten am TLR 4 (LPS) oder TLR 3 (Poly(I:C)), ein membranärer und ein intrazellulärer Toll-like-Rezeptor, der von Kupferzellen exprimiert wird und deren Aktivierung zu einem proinflammatorischen Cytokinsekretionsprofil führt (Nakamoto et al. 2014).

Eine Stimulation der Kulturen führte zumindest in der LPS-Kultur zu einer Größenzunahme der Zellen im Vergleich zur unbehandelten Referenzpopulation ebenso wie zu einer Steigerung der PDCA-1-Expression im Kupferzellkompartiment (Abb. 23). Eine Expression endothelialer Marker konnte ebenso mehrmals induziert werden, war aber, trotz eines konstanten Präparationsprotokolls nicht zuverlässig induzierbar, was eventuell auf den Einfluss geringer Differenzen, die beim Verdau der Leber unvermeidbar sind, zurückgeführt werden kann.

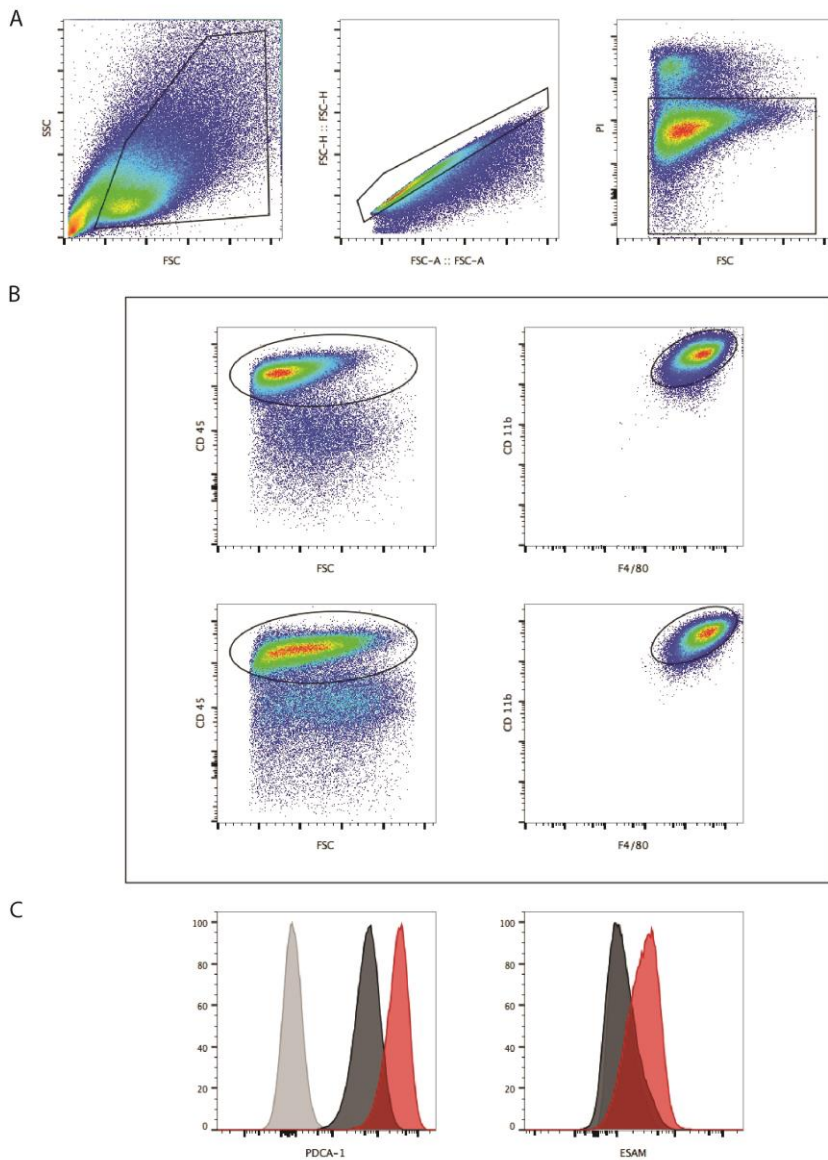


Abbildung 23 Veränderungen der Primärkultur durch Zugabe von LPS. Anzucht der Primärkultur für 7 Tage, danach Behandlung mit LPS für 3 Tage. **A** allgemeines Pregating **B** Zusammensetzung der Primärkultur mit (obere Zeile) und ohne (untere Zeile) LPS **C** Expression von PDCA-1 und ESAM auf den Kupferzellen der Primärkultur. Grau zeigt den unspezifischen Isotypen. Schwarz die Kultur nach PBS-Zugabe. Rot die Kultur nach LPS-Zugabe. Achsenbeschriftung der Dot plots in arbiträrer Einheit. Abszisse der Histogramme in arbiträrer Einheit. Ordinate der Histogramme in Prozent. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Das Ergebnis der ESAM-Stimulation war jedoch nicht in jedem Fall reproduzierbar, was auf kleine Differenzen im Präparationsprozess zurückgeführt werden kann.



## 5.10. RAW-Makrophagen als potentielles in-vitro-System

Aufgrund der problematischen Isolierung der verschiedenen Makrophagenpopulationen direkt aus der Leber, wurde ein neues experimentelles System gesucht, das eventuell den Phänotyp ESAM-positiver Makrophagen imitieren kann und damit in-vitro-Experimenten zugänglich macht. Zu diesem Zweck wurden kommerziell erhältliche RAW-Makrophagen eingesetzt und zunächst auf ihr Expressionsprofil in Bezug auf die oben dargestellten Oberflächenmarker hin untersucht.

Bei RAW-Makrophagen handelt es um eine immortalisierte Zellreihe aus Peritonealmakrophagen, die durch die peritoneale Lavage von Mäusen gewonnen wurde, bei denen experimentell eine Peritonitis induziert wurde (vgl. Kapitel 4.3.2).

Die Analyse der Zelllinie (Abb.24) zeigt, dass RAW-Makrophagen trotz der Isolation aus einem inflammatorischen Milieu einen Oberflächenphänotyp aufweisen, der organresidenten Makrophagen aus steady-state-Organen ähnelt. Sie exprimieren sowohl den Pan-Leukozytenmarker CD 45 wie auch F4/80, das als weitestgehend spezifisch für sessile Makrophagen gilt. Außerdem zeigen sie eine schwache Expression von Ly6C, dessen kräftige Expression als Hinweis auf einen monozytären Ursprung von Makrophagen gewertet wird.

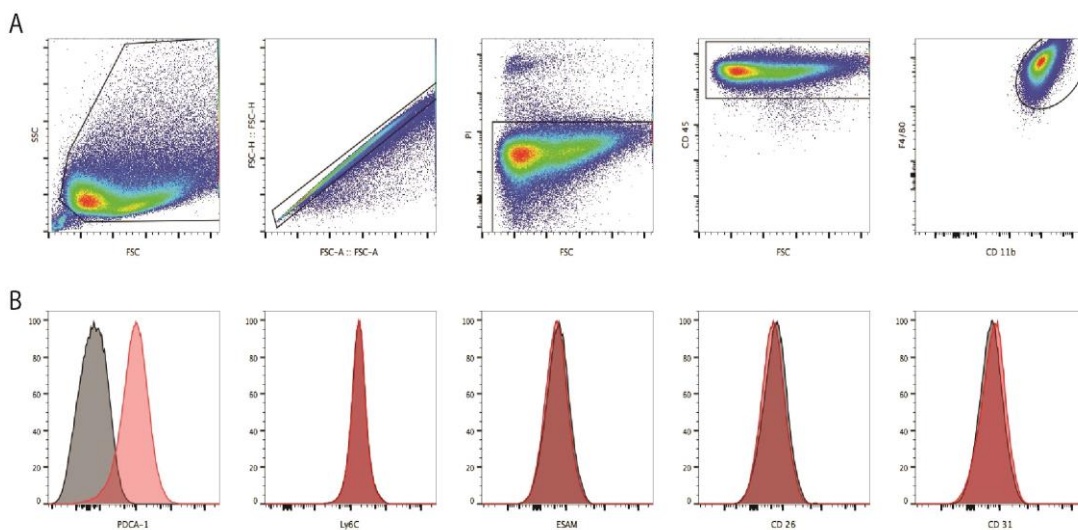


Abbildung 24 **A** Analyse der RAW-Zelllinie mit den Gates der Primärkultur **B** Expressionsprofil der RAW-Zelllinie. Achsenbeschriftung der Dot plots in arbiträrer Einheit. Abszisse der Histogramme in arbiträrer Einheit. Ordinate der Histogramme in Prozent. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Allerdings zeigen die Analysen auch, dass die auf Kupferzellen beobachteten endothelialen Marker wie ESAM oder CD 31 nicht auf den Zellen der Zelllinie auftauchen. Damit eignen sich RAW-Makrophagen ohne Weiteres nicht als Versuchssystem für die in-vitro-Analyse der Funktion der Zell-Zell-Kontakt mediiierenden Adhäsionsmoleküle.

### 5.11. Unterschiede im Zytokinsekretionsverhalten der Subpopulationen

Eine der zentralen Aufgaben von Kupferzellen und anderen Zellen des myeloischen Kompartiments ist die Sekretion von Zytokinen und anderen Botenstoffen. Auf diese Weise schaffen und erhalten sie, abhängig von Dauer und Beschaffenheit äußerer Stimuli, dem Ort und der Art des Einwirkens, sowie vieler weiterer individueller Faktoren ein pro- oder antiinflammatorisches Milieu. Für Kupfersche Zellen im Speziellen wurde gezeigt, dass sie als Antwort auf Stimulation mit viralen Agenzien IL-10 produzieren, ein

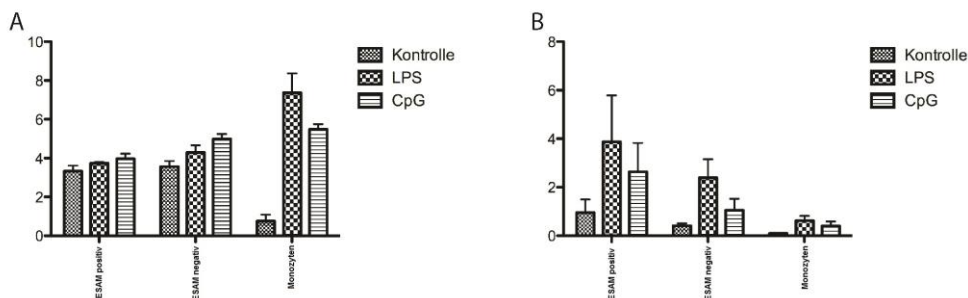


Abbildung 25: Unterschiede im Zytokinexpressionsverhalten zwischen den beiden Kupferzellpopulationen. **A** Expression von TNF  $\alpha$  mit und ohne LPS- und CpG-Stimulation. Die Abszisse zeigt die jeweilige unersuchte Population. Die Ordinate den Anteil der Zellen, deren Fluoreszenzsignal stärker als das des unspezifischen Isotyps ist in Prozent. Dargestellt ist das Arithmetische Mittel (Balken) und das Konfidenzintervall (kleine Linien) **B** Expression von Interleukin 10 mit und ohne LPS- und CpG-Stimulation. Die Abszisse zeigt die jeweilige unersuchte Population. Die Ordinate den Anteil der Zellen, deren Fluoreszenzsignal stärker als das des unspezifischen Isotyps ist in Prozent. Dargestellt ist das Arithmetische Mittel (Balken) und das Konfidenzintervall (kleine Linien)

antiinflammatorisches Zytokin, das akute Entzündungsreaktionen abmildert, jedoch mit der Chronifizierung viraler Hepatitien in Verbindung gebracht wird (Xu et al. 2010).

Dem gegenüber stehen Berichte, die Kupferzellen als zentrale Initiatoren der Entzündungsreaktion darstellen, da diese als Antwort auf Zelluntergänge TNF- $\alpha$  produzieren und an der Bildung eines proinflammatorischen Milieus beteiligt sind. (Su et al. 2018). Es sollte geprüft werden, ob diese diametral entgegengesetzten Funktionszuordnungen sich als unterschiedliche Funktionen der beiden hier analysierten

Untergruppen darstellen lassen. Hierzu wurden aus den Lebern unbehandelter B16 Mäuse Einzelzellsuspensionen hergestellt. Diese wurden für drei Stunden entweder mit LPS oder mit CpG behandelt (Abb. 25). Bei LPS handelt es sich um den ersten beschriebenen Liganden des Toll-like Rezeptor 4. LPS (das molekulare Korrelat zu dem von Paul Ehrlich postulierten „Endotoxin“) kommt in Natura in der Zellwand Gram-negativer Bakterien vor. Bei CpG handelt es sich um unmethylierte Nukleotidfragmente, welche als Liganden des intrazellulären Toll-like Rezeptors 9 bekannt sind. Als intrinsische Kontrolle wurden die Monozyten der Einzelzellsuspension untersucht, welche nicht dazu in der Lage sind IL-10 zu bilden, jedoch als Antwort auf TLR-Stimulation große Mengen TNF- $\alpha$  bilden.

Hierbei zeigt sich, dass Kupfferzellen bereits im steady-state geringe Mengen TNF-  $\alpha$  bilden. Die gebildete Menge steigert sich nach Zugabe inflammatorischer Stimuli kaum und unterscheidet sich ebenfalls nicht zwischen den beiden Subgruppen. Wie erwartet zeigen Monozyten im Ruhezustand keine Expression von TNF- $\alpha$ , jedoch nach Inkubation mit LPS oder CpG eine sehr ausgeprägte Steigerung der Bildung.

Umgekehrt zeigt sich eine deutliche Steigerung der Bildung von IL-10 vor allem im Bereich der ESAM-positiven Kupfferzellen nach Zugabe von LPS oder CpG. Wie erwartet zeigen Monozyten auch bei Zugabe inflammatorischer Stimuli keine signifikante Expression von IL-10.

Die Ergebnisse sind mit den Beobachtungen der Fachliteratur zur Deckung zu bringen, da auch hier die Zugabe von fragmentierten oder intakten Infektionserregern vor allem antiinflammatorische Reaktionen innerhalb des Kupfferzellkompartiments hervorzurufen vermochte, während die proinflammatorische Reaktion, so sie denn wirklich von Kupfferzellen im engeren Sinn ausgeht, vor allem als Reaktion auf nekrotische Zelluntergänge beobachtet werden konnte. Es zeigt sich ferner, dass innerhalb des Kupfferzellkompartiments durchaus eine gewisse funktionelle Unterscheidung getroffen werden kann. ESAM positive Kupfferzellen scheinen eine höhere sekretorische Aktivität aufzuweisen, als ESAM negative. Allerdings sollte hier keine dichotome Verteilung angenommen werden, da auch die letztgenannte Population zur Bildung von IL-10 in der Lage ist.

## 5.11. Etablierung eines In-vivo-Systems zur Untersuchung der Kupferzellaktivierung

Yoneama et al. nutzen zur Untersuchung der Formation tertiär lymphoidaler Strukturen in der murinen Leber ein Modell, das auf der Bildung einer granulomatösen Hepatitis nach i.v.-Injektion von hitzeinaktivierten *P.acnes* basiert. Hierzu setzten die Autoren 100 µg *P.acnes* ein, die einmalig injiziert werden. Unter diesen Bedingungen beobachteten die

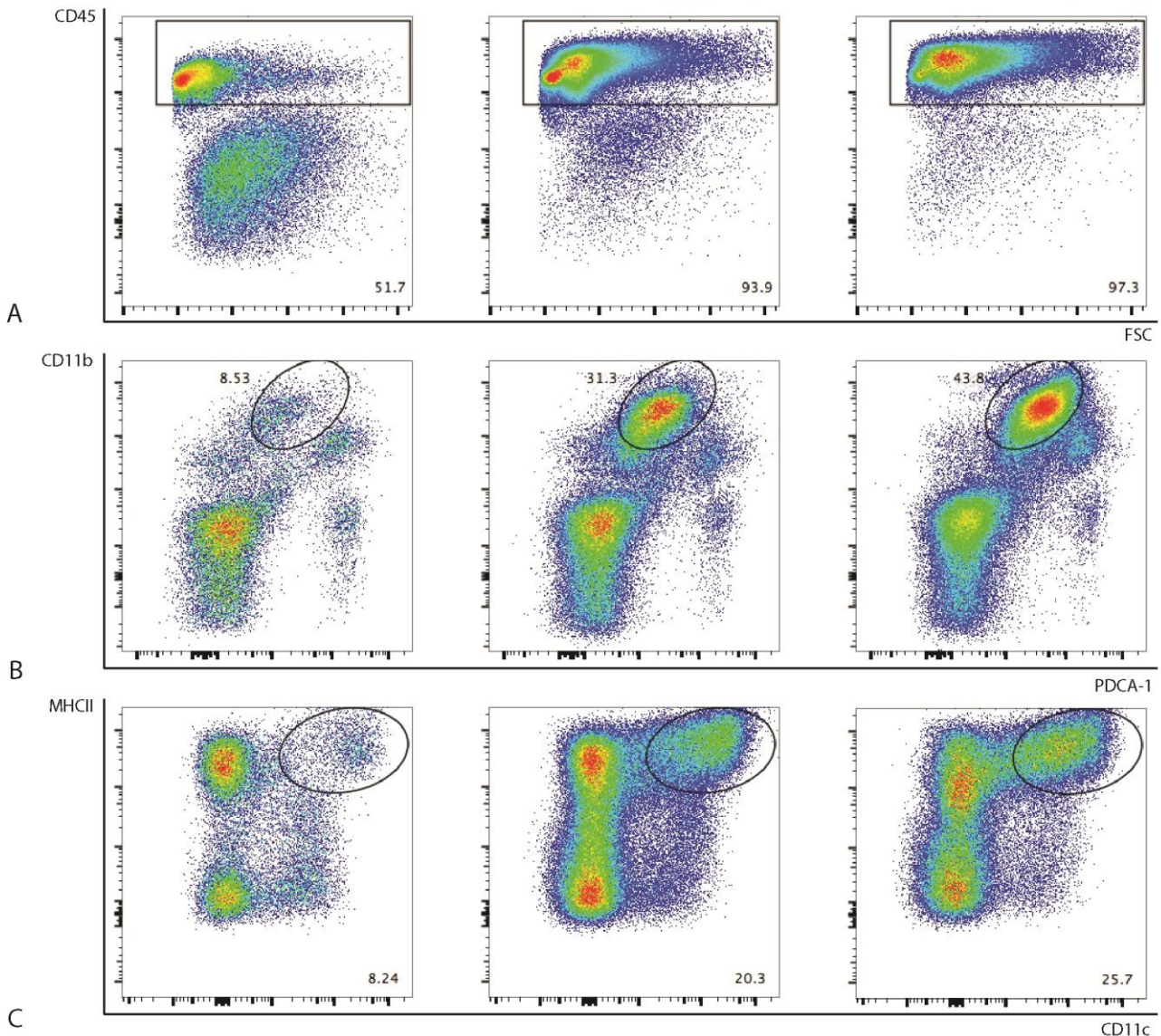


Abbildung 26: Ergebnisse der Durchflusszytometrie der Lebern 7 Tage nach *P.acnes*-Injektion. Behandlung mit PBS (**linke Spalte**), 20 µg (**mittlere Spalte**) und 100 µg *P.acnes* (**rechte Spalte**) (A) Darstellung der CD 45-positiven Zellen (Ordinate) und der Zellgröße (Abszisse). (B) Subgating CD 45 positiver Zellen. CD11b (Ordinate) und PDCA-1 (Abszisse) (C) Subgating CD 45 positiver Zellen. MHC II (Ordinate) und CD 11c (Abszisse). Ordinate und Abszisse zeigen Signalintensitäten in arbiträrer Einheit. Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Autoren entzündliche Läsionen, die von ihnen als „Granulome“ beschrieben werden, die aber auf den dargestellten mikroskopischen Aufnahmen nicht die in der Pathologie geforderten Eigenschaften eines Granuloms sensu strictu erfüllen: Weder finden sich Epitheloidzellen oder Riesenzellen noch wird eine zonale Gliederung der Läsion erkennbar, wie es beispielsweise bei der Sarkoidose oder der Tuberkulose der Fall ist. (Hu et al. 2017). Eher erinnern die abgebildeten Läsionen an die von *Blériot* und Kollegen beschriebenen „Mikroabzesse“, an deren Formation Kupfferzellen maßgeblich beteiligt sein sollen (Blériot et al. 2014). In den entsprechenden Arbeiten werden allerdings nur sehr stark vergrößerte Detailaufnahmen der Leber mit immunhistochemischen Färbungen verwendet, die keine Aussage über den Zustand des Leberparenchyms zulassen.

In den von mir durchgeführten Experimenten wurde allerdings deutlich, dass entsprechende Dosen zu ausgeprägten Leberzellnekrosen und Hämorrhagien führen, sodass eine Woche post injektionem nicht mehr zu klären ist, ob das entzündliche Geschehen primär als Folge der injizierten Noxe bestehen bleibt oder sekundäre Entzündungsvorgänge als Reaktion auf die ausgedehnten Leberzelluntergänge die Inflammation unterhalten.

Da Gegenstand der vorliegenden Experimente insbesondere die frühe Aktivierung von Kupfferzellen und die Folgen für Zahl und Differenzierung der leberresidenten Makrophagen sein sollte und diese insbesondere durch Hepatozytenuntergang direkt und indirekt stimuliert werden (Brempele et al. 2017) wurde in einem ersten Schritt versucht, eine Dosis zu finden, die in den Lebern der Versuchstiere eine suffiziente Entzündungsreaktion hervorruft, ohne zu den ausgedehnten Leberzellnekrosen zu führen, die bei 100 µg P.acnes Injektionsdosis auftreten.

Zu diesem Zweck wurden die Lebern von Mäusen sieben Tage nach der Injektion von PBS, 20 µg hitzeinaktivierten P.acnes oder 100 µg P.acnes sowohl histologisch als auch durchflusszytometrisch untersucht. Als Indikator für die Beschaffenheit des entzündlichen Infiltrates wurden sowohl dendritische Zellen als auch Makrophagen monozytären Ursprungs gewählt, da diese Gruppen sich insbesondere in frühen Phasen der Entzündungsreaktion, die in einem späteren Schritt adressiert werden sollten, ausdifferenzieren und zusammen mit neutrophilen Granulozyten den größten Anteil an gewebsinvasiven Leukozyten ausmachen.

Hierbei zeigte sich, dass die relative Zusammensetzung des Zellgemischs sich zwischen 20 µg und 100 µg Injektionsdosis nicht wesentlich unterscheidet, weder im Verhältnis Leukozyten zu nicht-leukozytären Zellen, noch im Verhältnis monozytäre Makrophagen zu

anderen Leukozyten. Auch der Anteil der dendritischen Zellen an der Gesamtleukozytenzahl blieb vergleichbar. Darüber hinaus zeigte sich das histologische Muster der Entzündung ebenso vergleichbar: Beide Injektionsdosen führen zu einem periportal und akzentuierten Entzündungsbild, allerdings sind bei beiden Injektionsdosen auch intralobuläre Entzündungsherde sichtbar. Der Versuch einer quantitativen Analyse der entzündlichen Läsionen mittels Zufallsbildern und Flächenanalyse (vergl. Kapitel 4.4.2.) erwies sich als nicht zielführend, wofür insbesondere die versuchspraktisch bedingte Variabilität der Anfärbeintensität der Zellkerne trotz Einsatz eines Färbeapparats verantwortlich gemacht werden kann. Deswegen musste eine Quantifikation des Entzündungsinfiltrats der Durchflusszytometrie vorbehalten bleiben, während die Beschreibung der Qualität und Lokalisation entzündlicher Herde weiter am Hämatoxylin/Eosin gefärbten Schnitt erfolgt. Anders als bei der Injektion von 100 µg P.acnes zeigten sich aber bei der geringeren Dosis keine Hepatozytennekrosen und Parenchymhämorrhagien (vergleiche Abb. 5). Auf der Grundlage dieser Beobachtungen wurde beschlossen, für die weiteren Experimente mit einer Dosis von 20 µg P.acnes pro Injektion fortzufahren.

In einem zweiten Schritt wurde versucht, einen besseren Zeitpunkt zur Analyse der Makrophagenzusammensetzung zu ermitteln. Hierzu wurde zunächst untersucht, an welchem Tag p.i. eine signifikante Veränderung des Entzündungsinfiltrates zu beobachten ist. Da Ergebnisse nach sieben Tagen bereits vorlagen und eine frühe Alteration der Leukozytenzusammensetzung der Leber

erwartet wurde, wurde zunächst ein dreitägiger Beobachtungszeitraum mit ganztägigen Abständen zwischen den Einzelmessungen gewählt. Die Auswertung der Daten (vgl. Abb. 26) zeigte in Bestätigung der Vorexperimente, dass zwischen der quantitativen Ausprägung der Entzündung bei verschiedenen Injektionsdosen P.acnes allenfalls geringe Unterschiede bestehen. Die Zahl der Leukozyten in der Leber nimmt im Verlauf der ersten drei Tage nach der Infektion stetig zu. Der erste signifikante, geringe, Unterschied der

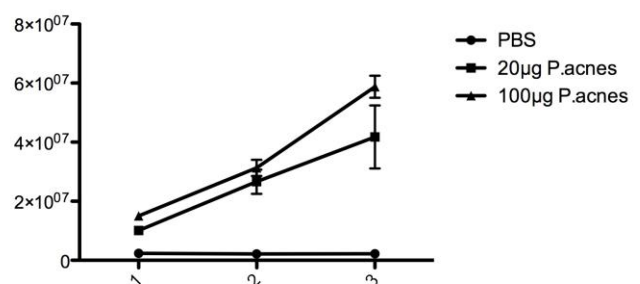


Abbildung 27: CD 45 positive Zellen in der Leber nach P.acnes Injektion. Die Abszisse zeigt ganze Tage post injectionem, die Ordinate absolute Zahlen. Dargestellt ist das arithmetische Mittel aller Versuchstiere und das Konfidenzintervall.

Leukozytenzahl trat am dritten Tag p.i. auf. Da bei der relativen Zusammensetzung des myeloischen Kompartiments der Leber im Rahmen der beobachteten Zellgruppen keine Unterschiede zwischen zwei und drei Tagen post injektionem beobachtet wurden, wurde aus versuchspraktischen Gründen für die folgenden Injektionsexperimente eine Zeit von drei Tagen beibehalten.

## 5.12. Veränderungen des Makrophagenkompartiments bei *P.acnes* induzierter Hepatitis

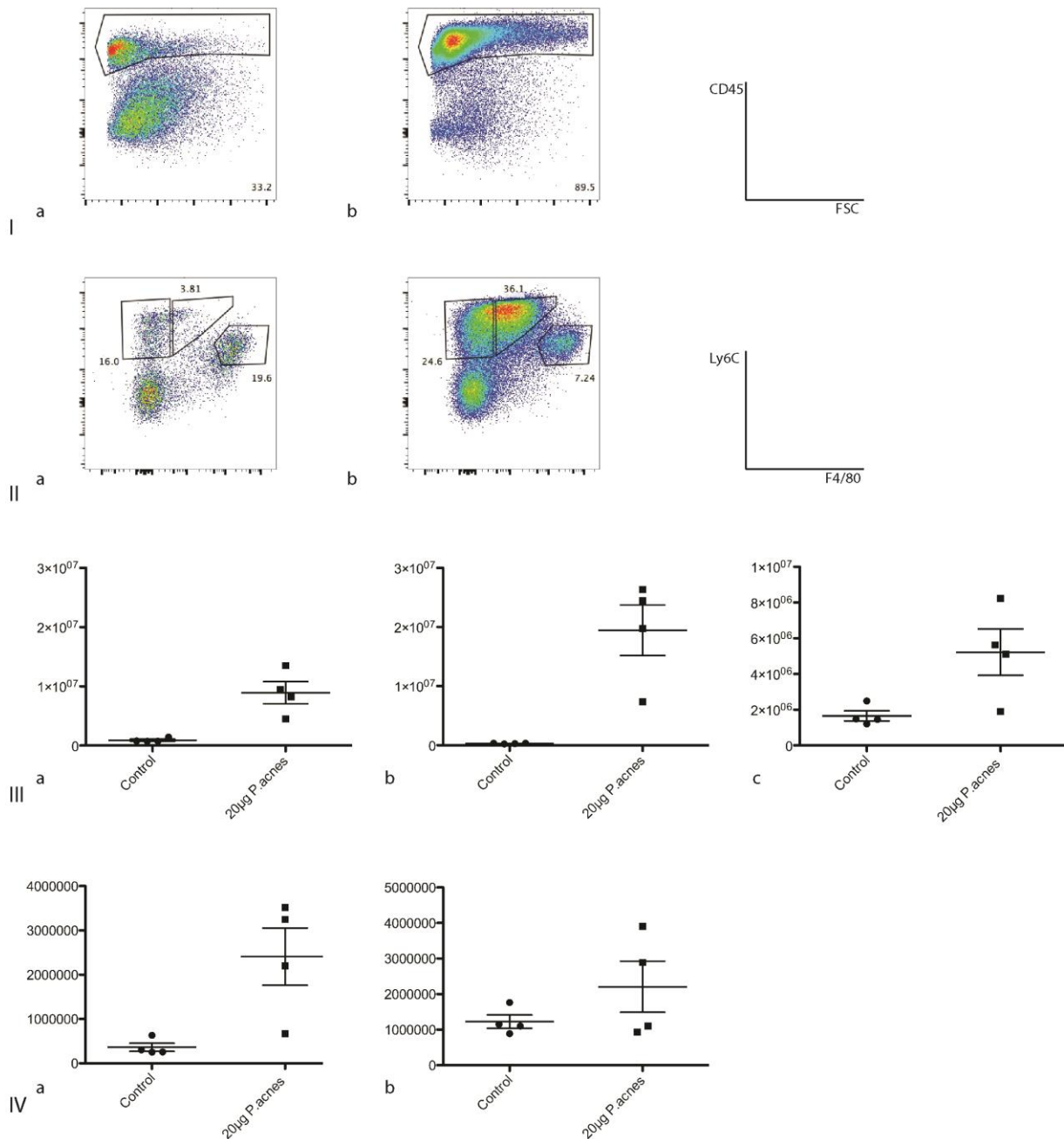


Abbildung 28 Ergebnisse der *P.acnes* Injektionsexperimente. **I** CD45 positive Leukozyten nach PBS-Injektion (a) oder Injektion von 20µg *P.acnes* (b) **II** Relative Zusammensetzung des Leukozytenkompartiments nach PBS-Injektion (a) und der Injektion von 20µg *P.acnes* (b) **III** Absolute Zellzahl pro Lappen für Monozyten (a, Ly6C positiv, F4/80 negativ), Makrophagen monozytären Ursprungs (b, Ly6C positiv, F4/80 schwach) und Kupferzellen (c, F4/80 hoch positiv, Ly6C schwach positiv). **IV** Absolute Zellzahl ESAM negativer (a) Kupferzellen und ESAM positiver (b). Achsbeschriftung der Dot plots in arbiträrer Einheit. Abszisse der Graphen von III und IV zeigt die Behandlungsgruppe, die Ordinate die absolute Zellzahl.



Nachdem die Rahmenparameter für die experimentelle Durchführung der P.acnes-Injektionsversuche bestimmt wurden, konnte in einem weiteren Schritt zunächst die numerische Veränderung der Zusammensetzung des Makrophagenkompartiments im Rahmen der P.acnes-induzierten granulomatösen Hepatitis analysiert werden. Da im Rahmen der meisten durchflusszytometrischen Untersuchungen lediglich die relativen Verhältnisse der einzelnen Makrophagenpopulationen zueinander untersucht werden, und diese keinen Aufschluss über den Zuwachs oder den Verlust einzelner Populationen zulassen, wurden bei den dargestellten Betrachtungen absolute Zahlen untersucht.

Abbildung 28 zeigt die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung der Lebern im Rahmen der Injektionsexperimente drei Tage post injectionem. Zur Darstellung kommt wie erwartet eine deutliche Entzündungsreaktion, dargestellt in I anhand der deutlichen Zunahme des Anteils CD45 positiver Leukozyten. Drei Tage post injectionem sind 9 von 10 nicht parenchymatösen Zellen Leukozyten. Dieser Zuwachs ist vor allem auf eine deutliche Zunahme Ly6C kräftig positiver, F4/80 schwach positiver Makrophagen zurückzuführen, deren Anteil am Leukozytenkompartiment von vier auf 35% zunimmt (Abb 25, II). Auch Ly6C kräftig positive, F4/80 negative Monozyten tragen stark zum Leukozytenzuwachs im entzündeten Organ bei. Wie in anderen Arbeiten beschrieben, nimmt dabei der relative Anteil der Kupfferschen Zellen von 20-25%, der CD 45 exprimierenden der Leber Zellen auf 5-10% ab (vgl. Blériot et al. 2014).

Betrachtet man aber die absoluten Zellzahlen (Abb. 28, III), dann fällt auf, dass die Gesamtzahl der Kupfferschen Zellen keineswegs abnimmt. Diese nimmt, auch bei vorsichtigem Gating, sogar um den Faktor drei zu (Abb. 28, IIIc). Im Zuge der entzündlichen Veränderungen nimmt die Zahl der Monozyten (Abb. 28, IIIa) und monozytenabhängigen Makrophagen (Abb. 28 IIIb) allerdings um den Faktor 100, bzw. 200 zu. Es handelt sich beim „Kupfferzellverlust“ unter den dargestellten Bedingungen eher um ein relatives Phänomen als einen absoluten numerischen Verlust.

Betrachtet man die beiden zuvor beschriebenen Kupfferzellsubpopulationen im Hinblick auf numerische Veränderungen in entzündeten Organen, stellt man fest, dass die Veränderungen des Gesamtkupfferzellkompartiments vor allem auf die ESAM-positive Population zurückzuführen sind. Diese zeigt einen deutlichen Zuwachs im entzündeten Zustand, beinahe um den Faktor fünf, während die ESAM negative Population nahezu unverändert bleibt. Welchem Kompartiment dieser numerische Zuwachs allerdings entspringt, ist anhand der vorliegenden Daten nicht zu klären. Prinzipiell kommt dafür

nahezu jedes zelluläre Kompartiment infrage, allerdings erscheint es wahrscheinlich, dass die Ursprünge der zusätzlichen Zellen der myeloischen Reihe zuzuordnen sind.

### **5.13. Einfluss einer Splenektomie auf die *P.acnes* medierte Hepatitis**

*Swirski et al.* zeigen in ihrer Arbeit zur Entzündungsreaktion auf Myokardinfarkte, dass hierbei eine spezielle Monozytenpopulation eine Rolle spielt, welche im Ruhezustand nicht im peripheren Blut zirkuliert, sondern in der Milz residiert (Swirski et al. 2009). Diese Beobachtung ist aus mehreren Gründen für diese Studie relevant: Die Milz ist als sekundär lymphatisches Organ im Pfortaderkreislauf der Leber vorgeschaltet. Während die Leber vor allem das Blut der unpaaren Bauchorgane filtert, liegt die zentrale Funktion der Milz zum Einen in der Filtration von strukturell geschädigten Erythrozyten. Zum Anderen beherbergt die Milz aber auch eine große Zahl spezialisierter immunologisch aktiver Zellpopulationen, die insbesondere im Blutstrom transportierte Erreger abwehren und am Priming von Lymphozyten beteiligt sind (Mebius et al. 2005). Milz und Leber zeigen bei der Bekämpfung von Infektionserregern ebenso wie bei der stofflichen Homöostase des Menschen eine enge Kooperation. Auch bei der Injektion von hitzeinaktivierten *P. acnes* zeigt sich eine ausgeprägte Mitreaktion der Milz im Sinne einer Splenomegalie (s.o.). Aus diesem Grund wurde in einem einfachen Überblicksexperiment geprüft ob die Reaktion splenischer Leukozyten einen Einfluss auf die Polarität der Kupfferzellen der Leber hat. Splenektomierten und altersgleichen B16-Mäusen wurde 20µg *P. Acnes* injiziert. Nach drei Tagen wurden das Makrophagenkompartiment der Mäuse auf seine numerische Zusammensetzung hin untersucht (Abbildung 29). A zeigt die Gates, die für die Zählung der Zellgruppen verwendet wurden. Monozyten, Makrophagen mit monozytärem Ursprung und Kupfferzellen wurden getrennt voneinander betrachtet. Tatsächlich scheint sich ein Unterschied in der Menge der die Leber infiltrierenden Monozyten zu ergeben (B). Dies ist die erste Beobachtung der Teilnahme von splenischen Monozyten an entzündlichen Veränderungen der Leber. Bei der Betrachtung der Kupfferzellen (C) zeigt sich kein Unterschied in der Verteilung der Einzelnen Kupfferzellpopulationen (Ca zeigt den Anteil der ESAM positiven Kupfferzellen am Gesamtkupfferzellkompartiment). Auch die Gesamtzahl der Kupfferzellen unterscheidet sich nicht zwischen splenektomierten und nicht-splenektomierten Tieren (Cc). Die Zahl der Makrophagen monozytären Ursprungs unterliegt einer größeren Streuung, scheint aber auch keinen großen Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen zu zeigen (Cb).

Die Versuche mit splenektomierten Mäusen zeigen zwei relevante Befunde: Anders als in der Hypothese angenommen zeigt sich kein Unterschied in der Verteilung ESAM positiver und ESAM negativer Kupfferzellen zwischen injizierten und nicht-injizierten Mäusen. Da dieses in dieser Studie die zentrale Frage war, wurden keine weiteren Experimente mit

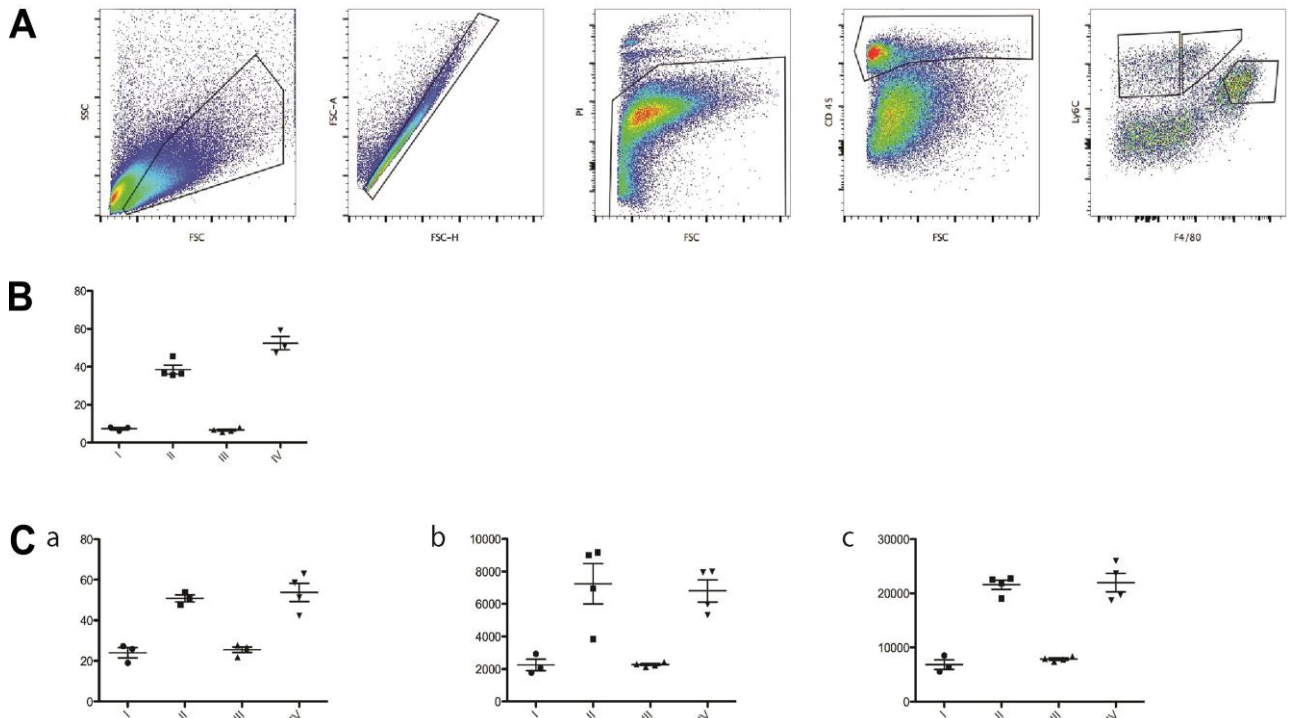


Abbildung 29: Einfluss einer Splenektomie auf die *P.acnes*-induzierte Hepatitis. **A** Gatingstrategie für die Bestimmung der Zellzahlen in den weiteren Analysen. **B** Anteil der Monozyten (in % der Gesamtleukozyten). **III** Veränderungen des Makrophagenkompartiments nach Injektion von *P.acnes* **Ca** Anteil von ESAM positiven Kupfferzellen **Cb** Makrophagen monozytären Ursprungs **Cc** Kupfferzellen Abszisse und Ordinate in **A** zeigen Signalintensität in arbiträrer Einheit. Abszisse in **B** und **C** zeigt Versuchsgruppe (I PBS Injektion + Splenektomie II *P. acnes* Injektion + Splenektomie III PBS Injektion – Splenektomie IV *P. acnes* Injektion – Splenektomie), Ordinate in **B** und **Ca** relative Anteile am Gesamtleukozytenkompartiment (**B**) bzw. der Gesamtkupfferzellzahl (**Ca**). Ordinate in **Cb** und **Cc** zeigt absolute Zellzahlen pro Leberlappen. Dargestellt ist jeweils das arithmetische Mittel und das Konfidenzintervall.

splenektomierten Tieren unternommen. Allerdings zeigte sich ein interessanter Nebenbefund: milzresidente Monozyten sind nicht nur an der fulminanten Reaktion auf (sterile) ischämische Myokardnekrosen beteiligt, sondern spielen auch eine Rolle bei der (durch bakterielle Substanzen getriggerten) *P.acnes*-induzierten Hepatitis. Hier bietet sich ein interessanter Ansatz für weitere Untersuchungen und gesonderte Studien, da diese Zellen lediglich in ausgeprägten Entzündungsreaktionen aufzutreten scheinen.

#### **5.14. Veränderungen der Makrophagenzusammensetzung bei MCD-induzierter Hepatitis**

Anders als bei der histologischen Analyse, bei der der geübte Histopathologe anhand des histomorphologischen Bildes Hinweise auf die Ätiologie eines entzündlichen Leberschadens finden kann, führt die geringe Anzahl gleichzeitig darstellbarer Marker in der Durchflusszytometrie zu großen Ähnlichkeiten im Bild von Hepatitiden unterschiedlicher Ätiologie. Eva-Carina Heier führte parallel zu meiner Arbeit Untersuchungen an dendritischen Zellen in genetisch unveränderten und BATF3 defizienten C57/Bl6 Mäusen durch, bei denen durch Füttern einer methionin-defizienten, cholinreichen Diät eine nicht-alkoholische Steatohepatitis induziert wurde (vgl. Heier et al. 2017). An diesen Mäusen konnte ich untersuchen, ob die beobachteten Veränderungen im Makrophagenkompartiment eventuell als spezifischer Hinweis für eine „unsterile“ Hepatitis dienen können. Auch wenn die verwendeten P.acnes-Kulturen vor der Injektion hitzeinaktiviert wurden, beinhaltet das Lysat immer noch Moleküle und molekulare Strukturen, die als „Pathogen-associated molecular Patterns“ fungieren können, ein Umstand, der bei der MCD-induzierten Hepatitis nicht primär vorliegt. Abbildung 30 zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen. Wie erwartet zeigt sich auch bei den MCD-behandelten Mäusen eine Zunahme der Gesamtleukozytenzahl in der Leber. Diese verläuft allerdings wesentlich langsamer als im Injektionsexperiment und erreicht weniger hohe Maxima. Nach fünf Wochen hat sich die Zahl der Monozyten und monozytenabhängigen Makrophagen gerade verdoppelt, die Zahl der Kupferzellen zeigt eine diskrete Abwärtstendenz, die allerdings nicht statistisch signifikant ist und in Kontrolle und MCD-Tieren gleichermaßen ausfällt. Ob dies eine allgemeine Alterungserscheinung der Mäuse darstellt oder ein Nebeneffekt der hochkalorischen Ernährung darstellt, geht weder aus der Literatur noch aus den vorliegenden Daten hervor.

Ebenso, wie sich das Kupferzellkompartiment nicht verändert, so zeigen auch die einzelnen Subpopulationen keine Veränderung in Abhängigkeit von der Diät. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Zahl der ESAM positiven Kupferzellen unabhängig von der Diät, aber in Abhängigkeit von der Zeit statistisch signifikant, aber numerisch wenig aussagekräftig abnimmt. Ob das Fehlen einer spezifischen Veränderung in der Zusammensetzung der betrachteten hepatischen myeloischen Zellen bei MCD-behandelten Mäusen auf die geringe entzündliche Potenz der Diät oder die langsam-

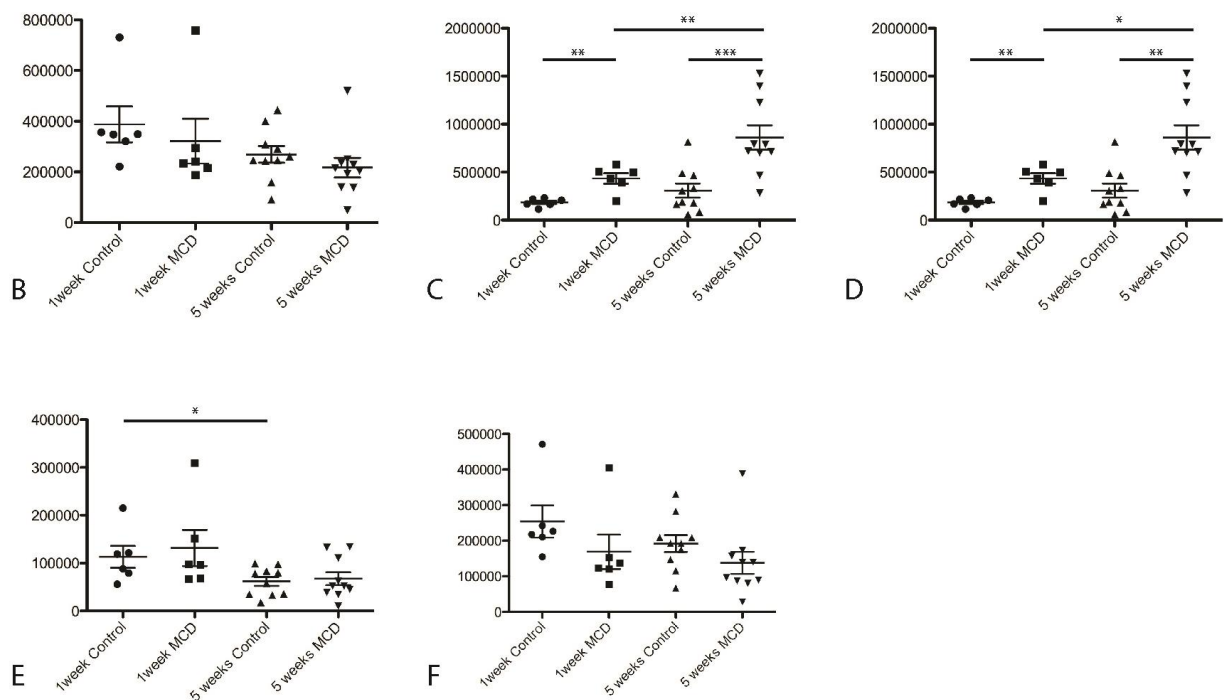
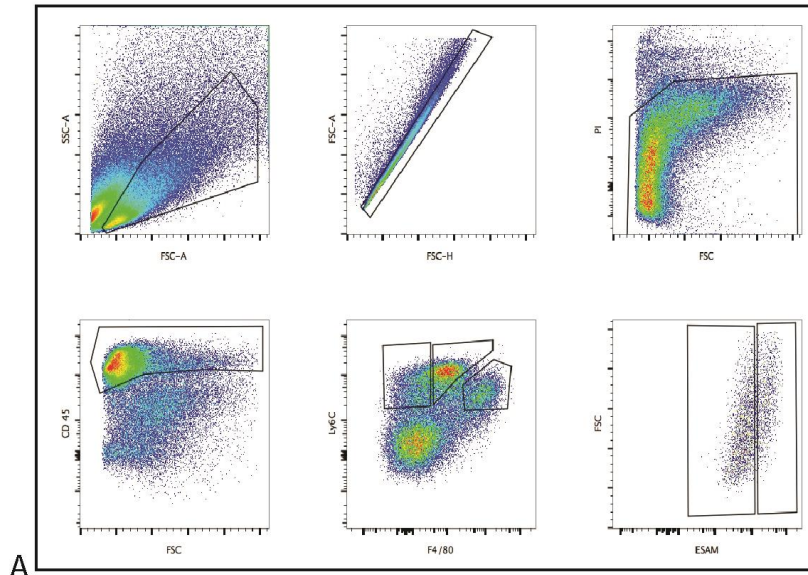


Abbildung 30: Numerisches Verhalten der hepatischen, myeloischen Populationen bei MCD-induzierter Steatohepatitis. **A** Gatingstrategie In der zweiten Zeile ist das Verhalten der drei getrennt voneinander untersuchten Populationen im Verlauf der MCD-Behandlung dargestellt. **(B)** Kupferzellen **(C)** Makrophagen von monozytärem Ursprung **(D)** Monozyten **(E)** ESAM positive Kupferzellen **(F)** ESAM negative Kupferzellen. Dot Plots zeigen Intensität in arbiträrer Einheit. Abszisse von B-F zeigt die Behandlungsgruppe, Ordinate die absolute Zellzahl pro Leberlappen. Dargestellt arithmetisches Mittel +/- Konfidenzintervall. Balken markieren signifikante Differenzen im Student's t-Test. \* Markiert einen p-Wert <0,05, \*\* einen p-Wert <0,005.

progrediente Entwicklung der Steatohepatitis im Verhältnis zur perakuten P.acnes

induzierten Hepatitis zurückgeht, ist hier nicht zu klären.

### 5.15. Abhängigkeit der Makrophagenzusammensetzung vom BATF3-Status

Bei ihren Untersuchungen konnten *Heier et al.* feststellen, dass BATF3-defiziente Mäuse im Rahmen der MCD-Behandlung zwar eine mit dem Wildtyp vergleichbare Steatose aufweisen, diese aber zu einer ausgeprägteren Entzündung führt (*Heier et al.* 2017). Sie konnte ferner demonstrieren, dass diese Unterschiede in der entzündlichen Aktivität auf CD103-positive, BATF3-abhängige dendritische Zellen zurückgeht. Um zu untersuchen, ob im Rahmen dieser alterierten Entzündungsreaktion Makrophagen ein verändertes Reaktionsmuster zeigen, wurden die BATF3-defizienten und Wildtypmäuse auch im Hinblick auf die Zusammensetzung ihres phagozytären Kompartiments untersucht.

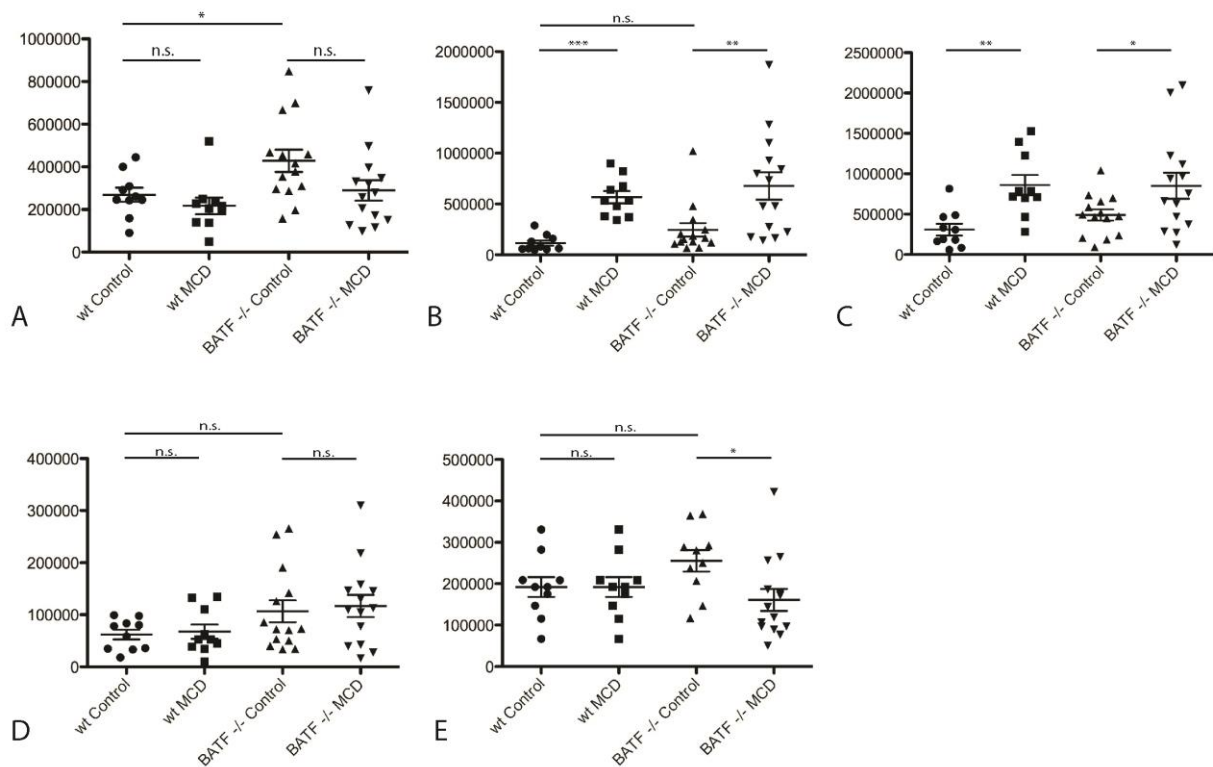


Abbildung 31: Abhängigkeit der myeloischen Populationen vom BATF3-Status. **A** Kupferzellen, **B** Makrophagen monozytären Ursprungs, und **C** Monozyten **D** ESAM-positive Kupferzellen **E** ESAM-negative Kupferzellen. Auf der Ordinate ist die absolute Zahl der Zellen in einem Leberlappen dargestellt. Auf der Abszisse die entsprechende Behandlungsgruppe. Balken markieren Ergebnisse im Student's t-Test. \* Markiert einen p-Wert <0,05, \*\* einen p-Wert <0,005.

Die Ergebnisse dieser rein numerischen Darstellung sind in Abbildung 31 dargestellt. Es zeigt sich hier, dass es im Bereich der Monozyten und der monozyten-abhängigen Makrophagen keine statistisch signifikanten Unterschiede, weder in der Kontrolle noch in der Behandlungsgruppe, gibt. Gleichzeitig zeigt sich auch, dass sich die Gesamtzahl der Kupfferschen Zellen, sowohl in der Kontrollgruppe, als auch in der Diätgruppe zwischen BATF3-defizienten und Wildtypmäusen unterscheidet. Dieser Unterschied ist in dieser Untersuchung zwar statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ), unter Zugrundelegung der großen Streuung der Ergebnisse bedarf diese Feststellung allerdings eine weit größere Probenzahl, um angenommen werden zu können. Die Betrachtung der Unterschiede in der Verteilung der durch ESAM getrennten Subpopulationen förderte weder einen Unterschied zwischen den MCD-behandelten und den mit der Kontrolldiät gefütterten Mäusen, noch zwischen den verschiedenen BATF3-Status zu Tage. Hier scheint keine Abhängigkeit zwischen BATF-Status und der Expression von ESAM durch Kupffersche Zellen zu bestehen.

Die unterschiedliche Entzündungsaktivität der BATF3-Knockoutmäuse ist also mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht auf eine numerische Abweichung im Bereich der klassischen Makrophagenpopulationen zurückzuführen.

### ***5.16. Nutzung der UV-Fluoreszenz von Schaumzellen zur Quantifikation der Steatohepatitis***

Lipidbeladene Makrophagen zeigen in ihrem Cytoplasma eine Vielzahl von Vesikeln, was den Zellen unter dem Mikroskop einen schaumigen Aspekt verleiht. So genannte Schaumzellen treten insbesondere bei Erkrankungen mit ausgeprägter Freisetzung von Lipiden bei lokalisierten und generalisierten Stoffwechselerkrankungen der Säugetiere auf. Sie finden sich in der atherosklerotischen Läsion, im Chalazion des Augenlides, im Rand simpler Fettgewebsnekrosen, ebenso wie bei komplexen systemischen Speicherkrankheiten wie bei den verschiedenen Varianten des Morbus Niemann-Pick oder einer Vielzahl weiterer Erkrankungen, die mit der Ablagerung von lipidartigen Substanzen einhergehen (Gater et al. 2017). Sie sind bei Mensch und Maus aber nicht typisch für die Steatosis hepatis oder die Steatohepatitis.

Bei MCD-induzierter Steatohepatitis findet man, dessen ungeachtet, insbesondere bei ausgeprägten entzündlichen Läsionen vereinzelte oder nestartig angeordnete Schaumzellen (Abb. 32). In anderen Tiermodellen für Steatose oder Steatohepatitis sind diese nicht in der Literatur beschrieben. Die besondere, artefizielle Zusammensetzung der methionin- und cholindefizienten, hochkalorischen Diät legt nahe, dass sich die Lipidvesikel in der MCD-Leber in ihrer chemischen Zusammensetzung von der Zusammensetzung bei der Steatosis hepatis durch Alkohol oder hochkalorische Nahrung, wie man sie beim Menschen antrifft, unterscheiden. Diese Hypothese wird durch die Zufallsbeobachtung gestützt, dass die Schaumzellen bei MCD-behandelten Mäusen im ultravioletten Licht fluoreszieren (Abb. 32). Da diese Eigenschaft von der Zusammensetzung der Lipide innerhalb der Vesikel abhängt (Wüstner et al. 2008), und bei den in der menschlichen Steatose/Steatohepatitis häufigen Triglyceriden und langkettigen Fettsäuren nicht dokumentiert ist, scheint hier eine besondere, auf fluoreszierenden Sterolen basierende Zusammensetzung der Vesikel vorzuliegen. Dieser Umstand ist in der Fachliteratur bis dato nicht beschrieben und kann, wenn auch keine weiteren Schlussfolgerungen daraus geschlossen werden dürfen doch zumindest als Hinweis auf den stark artefiziellen Charakter des Modells gewertet werden. Darüber hinaus liefert die Autofluoreszenz der Schaumzellen eventuell eine Möglichkeit diese genau zu quantifizieren und so eventuell unterschiedliche Differenzierungen der

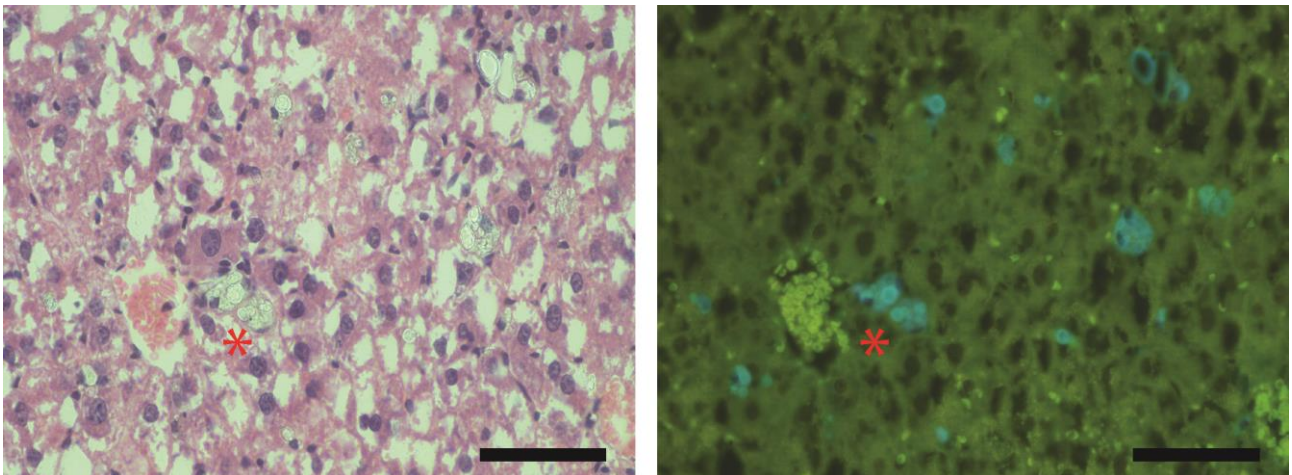


Abbildung 32: UV-Fluoreszenz in Schaumzellen bei MCD-induzierter Steatohepatitis. **Links:** HE-Aufnahme einer Leber mit MCD-induzierter Steatohepatitis. Hierbei zeigen sich mehrere, meist läppchenzentral gelegene Schaumzellaggregate, bestehend aus Zellen mit schaumigem Zytoplasma und randständigem Kern (mit rotem Stern markiert). **Rechts:** Schaumzellfluoreszenz unter UV-Licht. Maßstab 100  $\mu\text{m}$ .



unterschiedlichen Makrophagenpopulationen zu separieren.

Um Ersteres zu evaluieren wurden zunächst H&E gefärbte Schnitte unter UV-Licht betrachtet und aus zehn zufällig ausgewählten Arealen mit dem 10x Objektiv Aufnahmen gemacht. Anschließend erfolgte die Flächenanalyse mit ImageJ (siehe Kap. 4.6.2.). Mit diesem Vorgehen wurden MCD-behandelte und Kontrolltiere der Wildtyp- und der BATF3-defizienten Population untersucht. Wie die Abb. 32 und 33 zeigen, finden sich zwar sowohl in den BATF3-defizienten Tieren, wie auch in den genetischen Wildtypmäusen teils knotige Schaumzellaggregate.

Allerdings zeigt sich hier ebensowenig wie in der zuvor gezeigten durchflusszytometrischen Untersuchung Unterschiede zwischen BATF3-defizienten und Wildtypmäusen im Bezug auf das Makrophagenkompartiment.

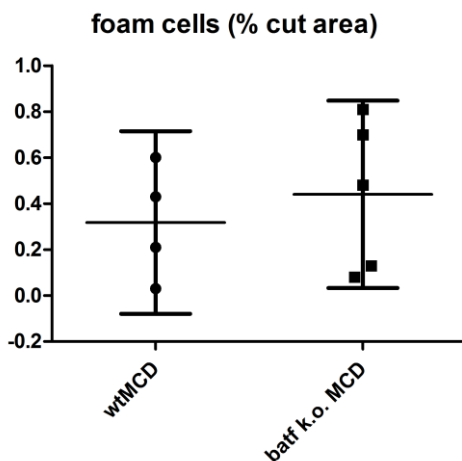


Abbildung 33 Flächenanalyse zur Quantifikation der MCD-Steatohepatitis. Aus drei je 50µm entfernten Schnittstufen durch die Mäuselebern wurden zehn zufällig ausgewählte Areale in vierhundertfacher Vergrößerung unter UV-Bestrahlung fotografiert und anschließend der Anteil blauer Bildpunkte (Fluoreszenz-Signal) an der Gesamtzahl der Bildpunkte bestimmt. Dargestellt ist das arithmetische Mittel und das Konfidenzintervall. Die Abszisse zeigt die Behandlungsgruppe. Die Ordinate den Anteil der blauen Bildpunkte an der Gesamtzahl der Bildpunkte in Prozent.

## 6. Diskussion

### **6.1. PDCA-1 als Makrophagenmarker in Gesundheit und Krankheit**

Neben der Verbreitung von PDCA-1 als Markermolekül plasmazytoider dendritischer Zellen konnten die Ergebnisse aus Kapitel 5.1. und 5.3. zeigen, dass das Molekül in der gesunden Mäuseleber ebenso wie in anderen Organen insbesondere auf organresidenten Makrophagen exprimiert wird. Dies wirft ein neues Licht auf die Experimente, die mit anti-PDCA-1-Antikörpern zur pDC-Depletion oder pDC-Anreicherung durchgeführt wurden (Davidson et al. 2014, Medina et al. 2014, Wittmann et al. 2013). Insbesondere vor dem Hintergrund der großen numerischen Überlegenheit organoresidenter Makrophagen im Vergleich mit plasmazytoiden dendritischen Zellen, sind die beobachteten Effekte nicht mit hinreichender Sicherheit alleine dem pDC-Kompartiment zuzuschreiben.

Gerade in Anbetracht der großen Fortschritte auf dem Gebiet der „target therapies“, auch für primär entzündliche Erkrankungen des Menschen ist die Differenzierung verschiedener myeloischer Populationen mit pro- und antiinflammatorischen Eigenschaften von vitaler Bedeutung. Mit PDCA-1 wurde zumindest in der Maus ein Marker gefunden, dessen Sensitivität und Spezifität für organresidente Makrophagen in der Leber nahe an F4/80 und MerTK heranreicht und damit den häufig verwendeten Markern CD11b, CD68 und CD11c weit überlegen ist. Bei dieser Beobachtung ist aber zu beachten, dass die Anzahl plasmazytoider Dendritischer Zellen in Lymphknoten und nicht-immunologischen Organen sehr große Unterschiede zwischen verschiedenen Mausstämmen aufweist (Asselin-Paturel et al. 2003, Davidson et al. 2014). Dies zeigt die starke genetische Determination des Verhältnis' verschiedener myeloischer Populationen zueinander, was insbesondere bei der Betrachtung der Spezifität des Markers Berücksichtigung finden muss. Auch bei der Übertragung auf den Menschen ist diesbezüglich Vorsicht geboten, weitere Studien müssen zeigen, ob das PDCA-1-Homolog im Menschen ein ähnliches Expressionsprofil zeigt.

Auch aus funktioneller Sicht wirft die Erkenntnis der PDCA-1-Expression auf Makrophagen Fragen auf. Auf anderen primär immunologisch aktiven Zellen dient PDCA-1 insbesondere der Induktion einer antiviralen Immunantwort. Neben der Fähigkeit, insbesondere behüllte Viren, an die Membran von PDCA-1-exprimierenden Zellen zu binden (daher der ebenfalls

verwendete Name Tetherin<sup>12</sup>), ist PDCA-1 auch ein Membranrezeptor für virale Partikel. Auf die Aktivierung von PDCA-1 auf pDCs folgt einerseits eine direkte Aktivierung des NfκB-Signalwegs und andererseits die Clathrin-vermittelte Endozytose viraler Partikel, was diese in die Reichweite intrazellulärer TLRs bringt. Diese führen am Ende einer Signalkaskade zu einer Aktivierung des Interferon-regulatory Factors, der die Expression von Typ-I-Interferonen kontrolliert (Mahauad-Fernandez et al. 2015). Auf diese Weise trägt PDCA-1 auf primär immunologisch aktiven Zellen wie pDCs sowohl mechanisch als auch direkt und indirekt als Signaltransduktor zur Wirtsverteidigung gegen Viren bei. Neuere Arbeiten zeigen darüber hinaus gehend die Expression von BST-2 auch auf nicht primär immunologisch aktiven Zellen wie Neuronen (Holmgren et al. 2015), wo es als Antwort auf Typ-I-Interferone gebildet wird und die antivirale Immunantwort verstärkt. Allerdings führt das Fehlen von BST-2 in Neuronen nicht zu einem Ausfall der Immunantwort. Interessanterweise können nicht nur virusassoziierte Signale zu einer erhöhten Expression von PDCA-1 führen, sondern auch primär bakterienassoziierte wie LPS (Jones et al. 2013). Der Beitrag von PDCA-1 zur Abwehr bakterieller Infektionen ist allerdings ebensowenig verstanden wie die intrazellulären Signalprozesse, die zur Erhöhung oder Reduktion der PDCA-1-Expression als Antwort auf LPS führen.

Diese Beobachtungen zeigen, dass die sowohl die regulierenden Faktoren, als auch die Funktionen von PDCA-1 sehr vielfältig sind. Insbesondere funktionelle Studien müssen zeigen, welche Konsequenzen die Aktivierung von PDCA-1 auf Kupfferschen Zellen nach sich ziehen und ob diese über das reine „tethering“ viraler Partikel hinausgehen. Weiterhin geht aus den vorliegenden Daten hervor, dass sowohl die metabolisch-induzierte „sterile“ Hepatitis als auch die durch inaktivierte Bakterien induzierte Hepatitis zu einer Erhöhung der PDCA-1-Expression auf den organresidenten Makrophagen der Leber führen. Auch hier müssen in-vitro-Ergebnisse zeigen, welche regulatorischen Mechanismen diesen Veränderungen zu Grunde liegen und ob sich funktionelle Unterschiede im PDCA-1-Signalweg unter sterilen und nicht-sterilen Bedingungen zeigen. Zu guter Letzt zeigen sich auf den durch die Expression vaskulärer Marker trennbaren Makrophagenpopulationen unterschiedliche Expressionslevel von PDCA-1, sowohl im Gesunden als auch im entzündeten Zustand.

Ob diese Differenz auch einen funktionellen Unterschied begründet, muss in weiteren Experimenten geprüft werden.

---

<sup>12</sup> Von engl. to tether: anbinden

## **6.2. Beiträge zum Verständnis der Kupferzellheterogenität**

Zieht man daneben weiter in Betracht, dass sich das Verhältnis zwischen ESAM positiven und ESAM negativen Kupferzellen während einer Entzündung zugunsten der ESAM positiven Kupferzellen verändert, bleiben mehrere Erklärungsansätze, die aus methodischen Gründen nicht in den hier dargestellten Experimenten geklärt werden konnten. Zum Einen ist denkbar, dass sowohl die Expression von PDCA-1 als auch die Expression endothelialer Markermoleküle einen „aktivierten“ Kupferzellzustand anzeigt, der mit entzündlichen Veränderungen der Leber vergesellschaftet ist. Um diese Hypothese zu falsifizieren sind funktionelle Studien vonnöten, die einen Unterschied der Einzelpopulationen im Hinblick auf Zeichen der Makrophagenaktivierung darzustellen vermögen. Insbesondere Phagozytose, Cytokinexpression und Antigenexpression sollten zu diesem Zweck ausgewertet werden. Zwar zeigen die durchgeführten Phänotypisierungsexperimente keine Differenz in der Expression von Molekülen, die mit der Antigenpräsentation assoziiert sind, dennoch ist durch die differentielle Expression von kostimulatorischen Molekülen ein Unterschied in der Funktion der Zellen denkbar. Ältere, elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten zeigen, dass in der Folge einer LPS-induzierten systemischen Entzündung bei Ratten sowohl die Größe von Kupferzellen zunimmt, als auch die Anzahl von Pseudopodien, die diese Zellen zur Vergrößerung der Oberfläche ausbilden, erhöht wird (Van Bossuyt et al. 1988). Diese Größenzunahme konnte auch in den hier vorliegenden Daten beobachtet werden (vgl. Abb. 20 und Abb. 23). Ob die Veränderung des Expressionsprofils von Kupferzellen in diesem Zusammenhang zu sehen ist, oder ein parallel auftretendes Phänomen darstellt, müssen ebenfalls funktionelle Studien an isolierten Kupferzellen zeigen.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die verschiedenen Kupferzellphänotypen ist, dass die morphologische Differenz nicht eine subsequente Differenzierungsabfolge sondern eine funktionelle Spezialisierung der beiden Kupferzellpopulationen darstellt. Diese Annahme würde beispielsweise von einigen älteren, elektronenmikroskopischen Untersuchungen gestützt, die von einer kleinen und einer großen Kupferzellpopulation sprechen, welche sich insbesondere in ihrer phagozytischen Aktivität unterscheiden. (Bouwens et al. 1986).

Die in dieser Arbeit beobachteten Unterschiede zwischen ESAM-positiven und ESAM-negativen Kupferzellen sind prinzipiell mit beiden dargestellten Hypothesen vereinbar und es bedürfte der Isolation einzelner Subgruppen, um Klarheit über die tatsächlichen in-vivo-Prozesse zu schaffen, die der Heterogenität von Kupferzellen zu Grunde liegen.

### **6.3. Einordnung der Kupfferschen Zellen *sensu strictu* ins myeloische Kompartiment der Leber**

Die derzeit gängige, theoretische Systematik der myeloischen Zellen der Leber kennt folgende Zelltypen (Eckert et al. 2015):

- Organoresidente Makrophagen *sensu strictu*, die so genannten Kupfferzellen, deren Vorläuferzellen im Verlauf der Embryonalentwicklung in die Leber einwandern und die im adulten Tier gänzlich unabhängig von knochenmarkständigen Vorläuferzellen durch eine nicht näher beschriebene Art der Selbsterneuerung bestehen. Sie sind primär abzugrenzen von:
- Patrouillierenden Monozyten, die von knochenmarkständigen Vorläuferzellen abstammen, unter Einfluss von CCL2/CCR2 das Knochenmark in die Blutbahn verlassen und das Gewebe auf der Suche nach Pathogenen unter dem Einfluss verschiedener Chemokine wie z.B. CCL5 durchwandern. Inflammatorische Stimuli wie LPS führen zur
- Monozyten-abhängige Makrophagen
- Dendritische Zellen

Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde zeigen zum einen, dass die Kategorie der organresidenten Makrophagen nicht homogen betrachtet werden kann (Vgl. Kapitel 6.2.). Sie bestätigen daneben auch, dass die in der Literatur behaupteten Eigenschaften von Kupfferzellen zuweilen nicht unter veränderten Bedingungen reproduzierbar sind. In den hier präsentierten Daten fällt insbesondere auf, dass die, zumindest numerisch betrachtet, strahlensensible Makrophagenpopulation, die als Kupfferzellen angesprochen wird, bei Transplantationsexperimenten gänzlich durch Zellen des Spenders ersetzt wird. Dies steht zunächst im Widerspruch zur oben beschriebenen Eigenschaft der ausschließlichen Selbsterneuerung, kann aber ebenso durch methodische Bedingungen verursacht sein. Zum einen stammt die Feststellung der Selbsterneuerung aus Experimenten mit Reporter-mäusen, bei denen keine sublethale Strahlendosis appliziert wurde. Im hier dargestellten Experiment wurde aber im Vorfeld der Bestrahlung eine hohe Dosis appliziert, die als solche schon entzündliche Begleitphänomene verursachen kann. In diesem Kontext ist nicht gezeigt, dass es nicht zum Influx durch Knochenmarkabhängige Vorläuferzellen ins Kupfferzellkompartiment kommen kann. Zum anderen wurde im

Experiment aus technischen Gründen keine isolierte Stammzelltransplantation durchgeführt, sondern eine Transplantation des gesamten Knochenmarks. Dies stellt eine stark artefizielle Situation dar, bei der sich die Zusammensetzung des peripheren Blutes auf eine Art verändert wird, die unter natürlichen Bedingungen nicht erreicht wird. Ein Einfluss dieser Konstellation auf die Zusammensetzung des Makrophagenkompartiments in der Leber ist nicht auszuschließen.

Da auch Makrophagen monozytären Ursprungs unter entzündlichen Bedingungen einen Phänotypen annehmen, der zumindest auf der Grundlage der in dieser Arbeit untersuchten Oberflächenmarker F4/80, Ly6C, CD11b, und PDCA-1 den Kupfferschen Zellen stark ähnelt, ist es sehr wahrscheinlich, dass auch in anderen Studien, die das Ziel einer Trennung der einzelnen myeloischen Populationen verfolgten letztlich Mischpopulationen als Untersuchungsgegenstand eingesetzt wurden (vgl. Kinoshita et al. 2010). Die große morphologische Ähnlichkeit der verschiedenen Makrophagen lässt darüber hinaus auch die Ergebnisse von konventionell lichtmikroskopischen und immunhistochemischen, bzw. mit Immunfluoreszenz durchgeführten Studien insbesondere vor dem Hintergrund der genauen Trennung zwischen Makrophagen monozytären Ursprungs und organresidenten Makrophagen fraglich erscheinen. Mit dem Lektin Clec4f wurde unlängst ein Molekül beschrieben, dessen Expression spezifisch auf Kupferzellen im engeren Sinne beschränkt sein soll (Scott et al. 2016). Jedoch wurde auch hier kein Versuch unternommen, der eine Aussage über die Spezifität dieses Markers im entzündeten Zustand zulässt. Dennoch öffnet sich auch hier eine weitere Möglichkeit der Generation von Reporter-mäusen. Auch die Lokalisation der Zellen innerhalb der Leberläppchen, ein häufig verwendetes Kriterium zur Unterscheidung von Kupferzellen und monozytenabhängigen Makrophagen unter dem Mikroskop, kann lediglich im gesunden Tier als verhältnismäßig sicher angesehen werden. Bei akuten und chronischen Leberschäden zeigt sich neben einer Störung der Läppchenarchitektur einerseits auch eine deutliche Zunahme CD68 und F4/80 positiver Zellen in den periportalen Feldern (Klein et al. 2007, Beljaars et al. 2014), was eine trennscharfe Unterscheidung der beiden Gruppen nicht mehr sicher möglich macht. Dazu kommt, dass die aktuelle Arbeit von *Sierro et al.* eine neue Makrophagenpopulation beschreibt, die in ihrem Phänotyp den klassischen Kupferzellen ähnelt, jedoch lediglich durch ihre unmittelbar subkapsuläre Lokalisation von diesen unterschieden werden kann (Sierro et al. 2017). Diese Makrophagen sind monozytären Ursprungs und weisen einen maximalen Abstand zur

Leberkapsel von 10 µm auf. Den Autoren zufolge sind diese spezialisierten „Kapselmakrophagen“ an der Phagozytose intraperitonealer Erreger beteiligt, eine Beobachtung die weiterer Validation bedarf. Die Beobachtung dieser Zellen bedarf eines Mikroskops mit hoher räumlicher Auflösung (die Autoren nutzen ein Zweiphotonenmikroskop) und sind in der herkömmlichen Immunhistochemie oder fluoreszenzgestützten Mikroskopie nicht beobachtbar. Auf Grund eines fehlenden spezifischen Expressionsprofils ist auch eine Darstellung mit Hilfe der Durchflusszytometrie bislang nur unter Inkaufnahme einer geringen Spezifität möglich. Auf Grund dieser methodischen Limitationen kann nicht ausgeschlossen werden, dass die in dieser Arbeit beobachtete Heterogenität der Kupfferzellen zumindest in geringem Umfang auch auf eine unterschiedliche räumliche Lokalisation der Zellen zurückgeführt werden kann.

Die von *Klein et al.* beobachtete Unterscheidung anhand der Herkunft aus dem Knochenmark war in den hier vorliegenden Daten nicht reproduzierbar und konnte daher auch nicht als Unterscheidungsmerkmal genutzt werden. Es konnte daher auch in dieser Arbeit nicht geklärt werden, ob es im Rahmen hepatischer Entzündungen zu einer Differenzierung knochenmarkstständiger myeloischer Zellen zu Kupfferzellen kommt. Im gesunden Zustand konnte unter Zuhilfenahme neuer Marker wie PDCA-1 oder MerTK der distinkte Expressionscharakter der organoresidenten Makrophagen bestätigt werden. Im entzündeten Zustand konnten die histologischen Erkenntnisse anderer Autoren (s.o.) auch durchflusszytometrisch bestätigt werden.

Die Untersuchungen von *Scott et al.* fügen der Komplexität einer Verortung der klassischen Kupfferzellen eine neue Ebene hinzu (Scott et al. 2016). Die Autoren zeigen in ihrer Arbeit, dass nach vollständiger Depletion der Kupfferzellen eine „Wiederaufforstung“ im adulten Tier auch aus dem Knochenmark erfolgen kann und folgern, dass die Selbsterneuerung der Kupfferzellen nicht Ausdruck einer mangelnden Potenz vorhandener Vorläuferzellen ist, sondern vielmehr in Zusammenhang mit einer besetzten „Nische“ gesehen werden muss. Vor diesem Hintergrund ist aber auch die in dieser Studie beobachtete Übernahme kupfferzelltypischer Expressionsprofile durch Makrophagen primär monozytären Ursprungs in einem gänzlich neuen Licht zu sehen.

Die schnelle Expansion F4/80 positiver Zellen in der Leber und die gleichzeitig kräftige Expression von Ly6C kann als starker Hinweis auf den Knochenmarksursprung dieser Zellen, die die größte Gruppe myeloischer Zellen im entzündeten Organ stellen, gelten.

Weiter untermauert würde diese Hypothese, insbesondere vor dem Hintergrund der mangelnden Zuverlässigkeit der Knochenmarktransplantation, durch den Einsatz von Reporter-mäusen, zum Beispiel der von *Gomez Perdiguero et al.* oder *Hoeffel et al.* eingesetzten (Gomez Perdiguero et al. 2015, Hoeffel et al. 2015) heterozygoten CSFR-Cre-Reportermaus.

#### **6.4. Numerische Veränderungen der myeloischen Populationen der Leber**

Verschiedene Publikationen der letzten zehn Jahre berichten von der Beobachtung, dass im Rahmen akuter hepatischer Entzündungen die Kupferzellpopulation zunächst schrumpft, um dann im Rahmen des Restitutionsprozesses der Erkrankung aus dem Pool der Monozyten und Makrophagen monozytären Ursprungs wieder aufgefüllt zu werden. (Blériot et al. 2014). Diesen Arbeiten liegt jedoch überwiegend die Kupferzellfrequenz zu Grunde, zumeist wird auf die Angabe absoluter Zahlen gänzlich verzichtet.

Im Rahmen der Experimente in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich weder bei der fulminanten, perakuten Hepatitis durch *Propionibacterium acnes*, noch bei der MCD-induzierten Steatohepatitis eine signifikante Veränderung der Kupferzellzahl zeigt. Im Gegenteil dazu nehmen vor allem die Zahlen der anderen am Entzündungsgeschehen beteiligten Zellen rapide zu. So sehr die ausbleibende Veränderung der Kupferzellhäufigkeit ein bislang nicht in der Literatur dargestelltes Phänomen darstellt, so wenig Aufschluss gibt uns diese Beobachtung über die tatsächlichen numerischen Vorgänge innerhalb des Kupferzellkompartiments. Es ist beispielsweise nicht zu klären, ob der ohnehin träge Zugewinn an Kupferzellen (Bouwens et al. 1986) nicht ausreicht, eine Veränderung der Zellzahl zu bewirken, oder ob im Gegenteil ein starker Verlust einen gesteigerten Zugewinn ausgleicht.

Es ist, auch vor dem Hintergrund der Transplantationsexperimente in dieser Arbeit, weiterhin denkbar, dass unter inflammatorischen Bedingungen eine Differenzierung von knochenmarkabhängigen Zellen zu einem kupferzellartigen Phänotyp stattfindet, der sich allerdings durch einen gleichzeitig auftretenden vermehrten Verlust nicht in absoluten Zahlen fassen lässt. In diesem Kontext ist insbesondere die von Blériot und Kollegen beschriebene erhöhte Apoptoserate Kupferscher Zellen im Kontext der akuten Leberentzündung durch intrazelluläre Erreger von Bedeutung (Blériot 2014). Es ist darüber



hinaus auch denkbar, dass ein stattfindender Kupfferzellverlust nicht als programmiertes Programm und Teil der Immunantwort verstanden werden kann, sondern eine passive Folge der Gewebsdestruktion darstellt. Auch hier bedarf es zur weiteren Einordnung der beobachteten Phänomene zumindest einer Isolierung einer möglichst reinen Kupfferzellpopulation oder dem Einsatz von Reporter-mäusen. Eine reine Darstellung der Proliferationsaktivität und der Apoptoserate (Blériot et al. 2014) ist aus den genannten Gründen nicht ausreichend. Die Aufreinigung der Kupfferzellen wird insbesondere durch die Größe der Kupfferschen Zellen erschwert, die eine sehr geringe vitale Ausbeute bei fluoreszenzgestützten Zellsortierungen bedingt. Die kommerziell erhältlichen Zellsortierungssysteme sind meist für kleinere Zellen (Lymphozyten, Monozyten) ausgelegt, die lediglich ein Fünftel bis ein Zehntel des Durchmessers von Kupfferzellen aufweisen. Die reine Anwendung dieser Systeme bedingt eine große mechanische Belastung der Einzelzelle, die sich in einer sehr geringen Viabilität ausdrückt. Eine reine magnetbasierte Zellsortierung bringt lediglich geringe Reinheiten, die zur Beantwortung der Frage nach der numerischen Zusammensetzung des Kupfferzellkompartiments nicht ausreichend sind.

Der Einsatz von Reporter-mäusen stellt auf Grund der notwendigen genetischen Veränderungen unter Umständen eine starke Alteration des Wildtyporganismus dar, die nicht notwendigerweise kontrollierbare Folgen mit sich bringt. Daneben sind der hohe Zucht- und Haltungsaufwand der Tiere und die hohen Kosten bei wenigen, spezialisierten Züchtern eine technische Problematik, die einer breit aufgestellten experimentellen Konstellation im Wege steht.

Dennoch sind profunde Einblicke in die zahlenmäßige Verteilung und die Kinetik verschiedener myeloischer Populationen der Leber zur Auswahl therapeutischer Targets unabdingbar und werden daher, aufgrund des Aufwandes meist in größeren Forschungsverbänden, stetig vorangetrieben.

Es sind also in naher Zukunft interessante Berichte auch von anderer Stelle zu erwarten.

## **7. Literatur**

### **7.1 Zeitschriftenartikel**

- Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM (2007) Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat. Neurosci.* 10: 1538-1543
- Asselin-Paturel C, Brizard G, Pin JJ, Brière F, Trinchieri G (2003) Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody. *J Immunol.* 171(12): 6466-6477
- Baeck C, Wehr A, Karlmark KR, Heymann F, Vucur M, Gassler N, Huss S, Klussmann S, Eulberg D, Luedde T, Trautwein C, Tacke F (2012) Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. *Gut* 61(3): 416-426
- Bain CC, Bravo-Blas A, Scott CL, Perdiguero EG, Geissmann F, Henri S, Malissen B, Osborne LC, Artis D, Mowat A (2014) Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat. Immunol.* 15(10): 929-938
- Balner H (1963) Identification of peritoneal macrophages in mouse radiation chimeras. *Transplant.* 1: 217-223
- Becic T, Bilan K, Mardesic S, Vukojevic K, Saraga-Babic M (2016) Spatiotemporal distribution of proliferation, proapoptotic and antiapoptotic factors in the early human limb development. *Acta histochem.* 118(5): 527-536.
- Beljaars L, Schippers M, Reker-Smit C, Martinez FO, Helming L, Poelstra K, Melgert BN (2014) Hepatic localization of macrophage phenotypes during fibrogenesis and resolution of fibrosis in mice and humans. *Front Immunol.* 5(430): 88-101
- Berghaus LJ, Moore JN, Hurley DJ, Vandenplas ML, Fortes BP, Wolfert MA, Boons GJ (2010) Innate immune responses of primary murine macrophage-lineage cells and RAW 264.7 cells to ligands of Toll-like receptors 2, 3, and 4. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 33(5): 443-454
- Bierly AL, Shufesky WJ, Sukhumavasi W, Morelli AE, Denkers EY (2008) Dendritic Cells Expressing Plasmacytoid Marker PDCA-1 Are Trojan Horses during *Toxoplasma Gondii* Infection. *J Immunol.* 181(12): 8485-8491

- Blériot C, Dupuis T, Jouvion G, Eberl G, Disson O, Lecuit M (2015) Liver-Resident Macrophage Necroptosis Orchestrates Type 1 Microbicidal Inflammation and Type-2-Mediated Tissue Repair during Bacterial Infection. *Immunity* 42: 145-158
- Brempele KJ, Crispe IN (2016) Infiltrating monocytes in liver injury and repair. *Clin Trans Immunology* 4;5(11):e113
- Brempele KJ, Yuen SY, Schwarz N, Mohar I, Crispe IN (2017) Central role of the TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon- $\beta$  (TRIF) adaptor protein in murine sterile liver injury. *Hepatology* 65(4): 1336-1551
- Brunt EM, Gouw ASH, Hubscher SG, Tiniakos DG, Bedossa P, Burt AD, Callea F, Clouston AD, Dienes HP, Goodman ZD, Roberts EA, Roskams T, Terraciano L, Torbenson MS, Wanless IR (2014) Pathology of the liver sinusoids. *Histopathology* 64(7): 907-920
- Bouwens L, Baekeland M, De Zanger R, Wisse E (1986) Quantitation, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells. *Hepatology* 6(4):718-722
- Calderon B, Carrero JA, Ferris ST, Sojka DK, Moore L, Epelman S, Murphy KM, Yokoyama WM, Randolph GJ, Unanue ER (2015) The pancreas anatomy conditions the origin and properties of resident macrophages. *J Exp Med.* 212 (10): 1497-1512
- Cassado AA, D'Imperio Lima MR, Bortoluci KR (2015) Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development and function. *Front. Immunol.* 6: 225
- Chow A, Lucas D, Hidalgo A, Méndez-Ferrer S, Hashimoto D, Scheiermann C, Battista M, Leboeuf M, Prophete C, van Rooijen N, Tanaka M, Merad M, Frenette PS (2011) Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J Exp. Med.* 208(2): 261-271
- Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, Akdis M, Andrä I, Annunziato F, Bacher P, Barnaba V, Battistini L, Bauer WM, Baumgart S, Becher B, Beisker W, Berek C, Blanco A, Borsellino G, Boulais PE, Brinkman RR, Büscher M, Busch DH, Bushnell TP, Cao X, Cavani A, Chattopadhyay PK, Cheng Q, Chow S, Clerici M, Cooke A, Cosma A, Cosmi L, Cumano A, Dang VD, Davies D, De Biasi S, Del Zotto G, Della Bella S, Dellabona P, Deniz G, Dessing M, Diefenbach A, Di Santo J, Dieli F, Dolf A, Donnerberg VS, Dörner T, Ehrhardt GRA, Endl E, Engel P, Engelhardt B, Esser C, Everts B, Dreher A, Falk CS, Fehniger TA, Filby A, Fillatreau S, Follo M, Förster I, Foster J, Foulds GA, Frenette PS, Galbraith D, Garbi N, García-Godoy MD, Geginat

J, Ghoreschi K, Gibellini L, Goettlinger C, Goodyear CS, Gori A, Grogan J, Gross M, Grützkau A, Grummitt D, Hahn J, Hammer Q, Hauser AE, Haviland DL, Hedley D, Herrera G, Herrmann M, Hiepe F, Holland T, Hombrink P, Houston JP, Hoyer BF, Huang B, Hunter CA, Iannone A, Jäck HM, Jávega B, Jonjic S, Juelke K, Jung S, Kaiser T, Kalina T, Keller B, Khan S, Kienhöfer D, Kroneis T, Kunkel D, Kurts C, Kvistborg P, Lannigan J, Lantz O, Larbi A, LeibundGut-Landmann S, Leipold MD, Levings MK, Litwin V, Liu Y, Lohoff M, Lombardi G, Lopez L, Lovett-Racke A, Lubberts E, Ludewig B, Lugli E, Maecker HT, Martrus G, Matarese G, Maueröder C, McGrath M, McInnes I, Mei HE, Melchers F, Melzer S, Mielenz D, Mills K, Mirrer D, Mjösberg J, Moore J, Moran B, Moretta A, Moretta L, Mosmann TR, Müller S, Müller W, Münz C, Multhoff G, Munoz LE, Murphy KM, Nakayama T, Nasi M, Neudörfl C, Nolan J, Nourshargh S, O'Connor JE, Ouyang W, Oxenius A, Palankar R, Panse I, Peterson P, Peth C, Petriz J, Philips D, Pickl W, Piconese S, Pinti M, Pockley AG, Podolska MJ, Pucillo C, Quataert SA, Radstake TRDJ, Rajwa B, Rebhahn JA, Recktenwald D, Remmerswaal EBM, Rezvani K, Rico LG, Robinson JP, Romagnani C, Rubartelli A, Ruckert B, Ruland J, Sakaguchi S, Sala-de-Oyanguren F, Samstag Y, Sanderson S, Sawitzki B, Scheffold A, Schiemann M, Schildberg F, Schimisky E, Schmid SA, Schmitt S, Schober K, Schüler T, Schulz AR, Schumacher T, Scotta C, Shankey TV, Shemer A, Simon AK, Spidlen J, Stall AM, Stark R, Stehle C, Stein M, Steinmetz T, Stockinger H, Takahama Y, Tarnok A, Tian Z, Toldi G, Tornack J, Traggiai E, Trotter J, Ulrich H, van der Braber M, van Lier RAW, Veldhoen M, Vento-Asturias S, Vieira P, Voehringer D, Volk HD, von Volkman K, Waisman A, Walker R, Ward MD, Warnatz K, Warth S, Watson JV, Watzl C, Wegener L, Wiedemann A, Wienands J, Willimsky G, Wing J, Wurst P, Yu L, Yue A, Zhang Q, Zhao Y, Ziegler S, Zimmermann J. (2017) Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *Eur J Immunol.* 47(10): 1584-1797.

Crofton RW, Diesselhoff-den Dulk MMC, van Furth R (1978) The origin, kinetics, and characteristics of the Kupffer Cells in the normal steady state. *J Exp Med* 148(1): 1-17

Den Haan JM, Lehar SM, Bevan MJ (2000) CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* 192(12): 1685-96

Dey A, Allen J, Hankey-Giblin PA (2015) Ontogeny and polarization of macrophages in inflammation: blood monocytes versus tissue macrophages. *Front Immunol* 5: 683

Davidson S, Crotta S, McCabe TM, Wack A (2014) Pathogenic potential of Interferon  $\alpha\beta$  in

- acute Influenza infection. *Nature Communication* 5: 3864
- Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S, Wu S, Lang R, Iredale JP (2005) Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *Journal of clinical Investigation* 115(1): 56-65
- Dugue GA, Descoteaux A (2014) Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. *Front Immunol.* 5: 491
- Duran-Struuck R, Dysko RC (2009) Principles of Bone Marrow Transplantation (BMT): Providing Optimal Veterinary Care to Irradiated Mice in BMT Studies. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 48(1): 11-22
- Eckert C, Klein N, Kornek M, Lukacs-Kornek V (2015) The complex myeloid network of the liver with diverse functional capacity at steady state and in inflammation. *Front Immunol* 6:179
- Edelson BT, Bradstreet TR, Hildner K, Carrero JA, Frederick KE, KC W, Belizaire R, Aoshi T, Schreiber RD, Miller MJ, Murphy TL, Unanue ER, Murphy KM (2011) CD8 $\alpha$ (+) dendritic cells are an obligate cellular entry point for productive infection by *Listeria monocytogenes*. *Immunity* 35(2): 236-248
- Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ (2014) Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* 41(1): 21-35
- Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- $\beta$ , PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 101:890–98
- Fallowfield JA, Mizuno M, Kendall TJ, Constandinou CM, Benyon RC, Duffield CS, Iredale JP (2007) Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis. *J Immunol* 178 (8): 5288-5295
- Fukui Y, Yamamoto A, Kyoden T, Kato K, Tashiro Y (1990) Quantitative immunogold localisation of dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) in Rat liver cells. *Cell Structure and Function* 15: 117-125
- Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, Helft J, Chow A, Elpek KG, Gordonov S, Mazloom AR, Ma'ayan A, Chau W-J, Hansen TH, Turley SJ, Merad M, Randolph GJ and the Immunological Genome Consortium (2012) Gene expression profiles and transcriptional regulatory pathways underlying mouse tissue macrophage identity and diversity. *Nat. immunology* 13(11):1118-1128.

- Ghosn EE, Cassado AA, Govoni GR, Fukuhara T, Yang Y, Monack DM, Bortoluci KR, Almeida SR, Herzenberg LA, Herzenberg LA (2010) Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal Macrophage subsets. *PNAS* 107: 2568-2573
- Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhalov IM, Merad M (2010) Fate mapping analysis reveals that adult Microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330: 841-845
- Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozet L, Garner H, Trouillet C, de Bruijn MF, Geissmann F, Rodewald HR (2015) Tissue resident macrophages originate from yolk-sack-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* 518: 547-551
- Gordon EJ, Rao S, Pollard JW, Nutt SL, Lang RA, Harvey NL (2010) Macrophages define dermal lymphatic vessels calibre during development by regulating lymphatic endothelial cell proliferation. *Development* 137: 3899-3910
- Gordon S, Hamann J, Lin HH, Stacey M (2011) F4/80 and the related adhesion-GPCRs. *Eur J Immunol* 41: 2470-2476
- Gordon S, Plüddemann A, Martinez Estrada F (2014) Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunological Reviews* 262(1): 36-55
- Gorrell MD, Gysbers V, McCaughan GW (2001) CD26: An integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology* 54(3): 249-264
- Gorrell MD, Wickson J, McCaughan GW (1991) Expression of the rat CD26 antigen (Dipeptidylpeptidase IV) on subpopulations of rat lymphocytes. *Cellular immunology* 134(1): 205-215
- Graubardt N, Vugman M, Mouhadeb O, Caligari G, Pasmanik-Chor M, Reuveni D, Zigmund E, Brazowski E, David E, Chappel-Maor L, Jung S, Varol C (2017) Ly6Chi Monocytes and Their Macrophage Descendants Regulate Neutrophil Function and Clearance in Acetaminophen-Induced Liver Injury. *Front Immunol* 8: 626
- Guilliams M, Ginhoux F, Jakubzick C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, Segura E, Tussiwand R, Yona S (2014) Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nature Reviews of Immunology* 14: 571-578
- Gyorki DE, Asselin-Labat ML, van Rooijen N, Lindeman GJ, Visvader JE (2009) Resident macrophages influence stem cell activity in the mammary gland. *Breast Cancer Res* 11: R62

- Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, Becker CD, See P, Price J, Lucas D, Greter M, Mortha A, Boyer SW, Forsberg EC, Tanaka M, van Rooijen N, Garcia-Sastre Adolfo, Stanley ER, Ginhoux F, Frenette PS, Merad M (2013) Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulation monocytes. *Immunity* 38: 793-804
- Gater DL, Widatalla N, Islam K, AlRaessi M, Teo JCM, Pearson YE (2017) Quantification of sterol-specific response in human macrophages using automated imaged-based analysis. *Lipids in health and disease* 16(1): 242
- Heier EC, Meier A, Julich-Heartel H, Djudjaj S, Rau M, Tschernig T, Geier A, Boor P, Lammert F, Lukacs-Kornek V (2017) Murine CD103+ dendritic cells protect against steatosis progression to steatohepatitis. *Journal of Hepatology* 6(66): 1241-1250
- Heymann F, Tacke F (2016) Immunology in the liver – from homeostasis to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 13(2): 88-110
- Heymann F, Peusquens J, Ludwig-Portugall I, Kohlhepp M, Ergen C, Niemietz P, Martin C, van Rooijen N, Ochando JC, Randolph GJ, Luedde T, Ginhoux F, Kurts C, Trautwein C, Tacke F (2015) Liver inflammation Abrogates Immunological Tolerance Induced by Kupffer Cells. *Hepatology* 62: 279-291.
- Hildner K, Edelson BT, Purtha WE, Diamond M, Matsushita H, Kohyama M, Calderon B, Schraml B, Unanue ER, Schreiber RD, Murphy TL, Murphy KM (2009) Baff3 Deficiency Reveals a Critical Role for CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Dendritic Cells in Cytotoxic T Cell Immunity. *Science* 322(5904): 1097-1100
- Hoeffel G, Chen J, Lavin Y, Low D, Almeida FF, See P, Beaudin AE, Lum J, Low I, Forsberg EC, Poidinger M, Zolezzi F, Labri A, Ng LG, Chan JYK, Greter M, Becher B, Samokhvalov IM, Merad M, Ginhoux F (2015) C-Myb<sup>+</sup> Erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident Macrophages. *Immunity* 42: 665-678
- Holmgren AM, Miller KD, Cavanaugh SE, Rall GF (2015) Bst2/Tetherin Is Induced in Neurons by Type I Interferon and Viral Infection but Is Dispensable for Protection against Neurotropic Viral Challenge. *Journal of Virology* 89(21): 11011-11018
- Hossain M, Qadri SM, Xu N, Su Y, Cayabyab FS, Heit B, Liu L (2015) Endothelial LSP1 Modulates Extravascular Neutrophil Chemotaxis by Regulating Nonhematopoietic Vascular PECAM-1 Expression. *Journal of Immunology* 195(5): 2408-16
- Hume DA (2008) Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *J Imm.* 181: 5829-5835
- Italiani P, Boraschi D (2014) From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical

- vs. Functional differentiation. *Frontiers of Immunology* 5: 514
- Jacobs A, Warda AS, Verbeek J, Cassiman D, Spincemaille P (2016) An Overview of Mouse Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: From Past to Present. *Current Protocols in mouse biology* 6(2): 185-200
- Jones PH, Okeoma CM (2013) Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in Toll-like receptor 4-mediated BST-2/tetherin regulation. *Cellular signalling* 25(12) 2752-2761
- Kaisho T, Ishikawa J, Oritani K, Inazawa J, Tomizawa H, Muraoka O, Ochi T, Hirano T (1994) BST-1, a surface molecule of bone marrow stromal lines that facilitates B cell growth. *PNAS* 91: 5325-5329
- Karlmarm KR, Zimmermann HW, Roderburg C, Gassler N, Wasmuth HE, Luedde T, Trautwein C, Tacke F (2010) The fractalkine receptor CX<sub>3</sub>CR1 protects against liver fibrosis by controlling differentiation and survival of infiltrating hepatic monocytes. *Hepatology* 52(5): 1769-1782
- Kinoshita M, Uchida T, Sato A, Nakashima M, Nakashima H, Shono S, Habu Y, Miyazaki H, Hiroi S, Seki S (2010) Characterization of two F4/80-positive Kupffer cell subsets by their function and phenotype in mice. *Journal of Hepatology* 53: 903-910
- Kitani K, Taplin GV (1972) Biliary Excretion of 99mTc-Albumin Microaggregate Degradation Products (A Method for Measuring Kupffer Cell Digestive Function?). *Journal of Nuclear Medicine* 13: 260-265
- Klein I, Cornejo JC, Polakos NK, John B, Wuensch SA, Topham DJ, Pierce RH, Crispe IA (2007) Kupffer cell heterogeneity: functional properties of bone marrow-derived and sessile hepatic macrophages. *Blood* 110: 4077-4085
- Kordes C, Sawitza I, Götze S, Schumacher E, Häussinger D (2015) Beyond fibrosis: stellate cells as liver stem cells. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 53(12): 1425-1431
- Krenkel O, Tacke F (2017) Liver Macrophages in Health and Disease. *Nature Reviews in Immunology* 17: 306-321
- Kucera O, Cervinkova Z (2014) Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World Journal of Gastroenterology* 20 (26): 8364-8376.
- Kupffer C (1876) Über Sternzellen der Leber. Briefliche Mitteilung an Prof. Waldeyer. *Arch mikr Anat* 12: 353-358
- Kupffer C (1899) Über die sogenannten Sternzellen der Säugethierleber. *Arch mikr. Anat* 54: 254-288
- Kurotaki D, Uede T, Tamura T (2015) Functions and development of red pulp macrophages. *Microbiol Immunol* 59(2):55-62



- Kuziel WA, Morgan SJ, Dawson TC, Griffin S, Smithies O, Ley K, Maeda N (1997): Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *PNAS* 94: 12053-12058
- Lavin Y, Winter D, Blecher-Gonnen R, David E, Keren-Saul H, Merad M, Jung S, Amit I (2014): Tissue-resident Macrophage Enhancer Landscapes Are Shaped by the Local Microenvironment. *Cell* 159: 1321-1326
- Lemke G, Rothlin CV (2008): Immunobiology of the TAM receptors. *Nat Rev Immunology* 8: 327-326
- Liasakou E, Zimmermann HW, Li KK, Oo YH, Suresh S, Stamataki Z, Qureshi O, Lalor PF, Shaw J, Syn WK, Curbishley SM, Adams DH (2013): Monocyte subsets in human liver disease show distinct phenotypic and functional characteristics. *Hepatology* 57(1): 385 -398
- Lin HH, Faunce DE, Stacey M, Terajewicz A, Nakamura T, Zhang-Hoover J, Kerley M, Mucenski ML, Gordon S, Stein-Streilein J (2005) The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance. *J Exp Med* 201: 1615-1625
- Machado MV, Michelotti GA, Xie G, Pereira de Almeida T, Boursier J, Bohnic B, Guy CD, Diehl AM (2015) Mouse Models of Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis Reproduce the Heterogeneity of the Human Disease. *PLOS One* 10(5): e0127991
- Mahauad-Fernandez WD, Okeoma CM (2015) The role of BST-2/Tetherin in host protection and disease manifestation. *Immunity, Inflammation and Disease* 4(1): 4-23
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology* 25: 677-686
- Marques PE1, Amaral SS, Pires DA, Nogueira LL, Soriani FM, Lima BH, Lopes GA, Russo RC, Avila TV, Melgaço JG, Oliveira AG, Pinto MA, Lima CX, De Paula AM, Cara DC, Leite MF, Teixeira MM, Menezes GB (2012) Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to amplify organ injury during mouse acute liver failure. *Hepatology* 56(5): 1971-1982
- Martinez FO, Gordon S (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000 Prime Report* 6: 13
- Martinez-Lopez M, Iborra S, Conde-Garrosa R, Sancho D (2015) BATF3-dependent CD103+ dendritic cells are major producers of IL-12 that drive local Th1 immunity

- against *Leishmania major* infection in mice. *European Journal of Immunology* 45(1): 119-29
- Mashayekhi M, Sandau MM, Dunay IR, Frickel EM, Khan A, Goldszmid RS, Sher A, Ploegh HL, Murphy TL, Sibley LD, Murphy KM (2011) CD8 $\alpha$ (+) dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Immunity* 35(2): 249-259
- Mass E, Ballestros I, Farlik M, Halbritter F, Günther P, Crozet L, Jacome-Galarazza E, Händler K, Klughammer J, Kobayashi Y, Gomez-Perdiguero E, Schultze JL, Beyer M, Bock C, Geissmann F (2016) Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis. *Science* 353: aaf4238
- McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse CCM, Beck PL, Muruve DA, Kubers P (2011) Intravascular Danger Signals Guide Neutrophils to Sites of Sterile Inflammation. *Science* 330: 362-366
- McGarry MP, Stewart CC (1991) Murine eosinophil granulocytes bind the murine macrophage-monocyte specific monoclonal antibody F4/80. *Journal of leukocyte biology* 50: 5471-5478
- Mebius RE, Kraal G (2005) Structure and function of the spleen. *Nature Rev Immun* 5: 606-616
- Medina KL, Tangen SN, Seaburg LM, Thapa P, Gwin KA, Shapiro VS (2013) Separation of plasmacytoid dendritic cells from B-cell-biased lymphoid progenitor (BLP) and Pre-pro B cells using PDCA-1. *PloS One* 8(10):e78408
- Metschnikoff I (1884) Untersuchungen über die mesodermalen Phagozyten einiger Wirbeltiere. *Biologisches Zentralblatt* bd. 3: 560-565
- Metschnikoff I (1884) Über die pathologische Bedeutung der intracellulären Verdauung. *Fortschritte der Medizin* No. 17. 1-12
- Mossanen JC, Krenkel O, Ergen C, Govaere O, Liepelt A, Puengel T, Heymann F, Kalthoff S, Lefebvre E, Eulberg D, Luedde T, Marx G, Strassburg CP, Roskams T, Trautwein C, Tacke F (2016) Chemokine (C-C Motif) Receptor 2-Positive Monocytes Aggravate the Early Phase of Acetaminophen-Induced Acute Liver Injury. *Hepatology* 64 (5): 1667-1682
- Mukkerjee SK, Wilhelm A, Antoniades CG (2016) TAM receptor tyrosine kinase function and the immunopathology of liver disease. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and liver physiology* 310(11): G899-G905

- Muller WA (2011) Mechanisms of Leukocyte Transendothelial Migration. *Annual reviews of Pathology* 6: 323-344
- Murray RZ, Stow JL (2014) Cytokine secretion in macrophages: SNAREs, Rabs and membrane trafficking. *Frontiers in Immunology* 5: 538
- Naito M, Hasegawa G, Takahashi K (1997) Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells. *Microscop Res Tech* 39: 350-64
- Nakamoto N, Kanai T (2014) Role of toll-like receptors in immune activation and tolerance in the liver. *Frontiers in Immunology* 5:221
- Nobumoto A, Oomizu S, Arikawa T, Katoh S, Nagahara K, Miyake M, Nishi N, Takeshita K, Niki T, Yamauchi A, Hirashima M (2009) Galectin-9 expands unique macrophages exhibiting plasmacytoid dendritic cell-like phenotypes that activate NK cells in tumor-bearing mice. *Clinical Immunology* 130(3): 322-330
- Nusrat AR, Wright SD, Aderem AA, Steinman RM, Cohn ZA (1988) Properties of isolated red pulp macrophages from mouse spleen. *Journal of experimental medicine* 168(4): 1505-1510
- Okabe Y, Medzhitov R (2014) Tissue-specific signals control reversible program of Localization and functional polarization of macrophages. *Cell* 157: 832-844
- Okada T, Kimura A, Kanki K, Nakatani S, Nagahara Y, Hiraga M, Watanabe Y (2016) Liver resident Macrophages (Kupffer Cells) Share Several Functional Antigens in Common with Endothelial Cells. *Scandinavian Journal of Immunology* 83(2): 139-150
- O'Keeffe M, Mok WH, Radford KJ (2015) Human dendritic cell subsets and function in health and disease. *Cell Mol Life Science* 72: 4309-4325
- Pinkett MO, Cowdrey CR, Nowell PC (1966) Mixed hematopoietic and pulmonary origin of 'Alveolar Macrophages' as demonstrated by chromosome markers. *Am. J. Pathol.* 48:859.
- Qin CC, Liu YN, Hu Y, Yang Y, Chen Z (2017) Macrophage inflammatory Protein-2 as mediator of inflammation in acute liver injury. *World J Gastroenterology* 23(17): 3043-3052
- Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I (1978) Functional macrophage cell line transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* 15: 261-267
- Ramachandran P, Pellicoro A, Vernon MA, Boulter L, Aucott RL, Ali A, Hartland SN, Snowdon VK, Cappon A, Gordon-Walker TT, Williams MJ, Dunbar DR, Manning JR, van Rooijen N, Fallowfield JA, Forbes SJ, Iredale JP (2012) Differential Ly-6C

- expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: E3186–E3195
- Regoli M, Bertelli E, Gulisano M, Nicoletti C (2017) The multifaced personality of intestinal CX3CR1+ Macrophages. *Trends in Immunology* 38(12): 879-887
- Rivollier A, He J, Kole A, Valatas V, Kelsall BL (2012) Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *J. Exp. Med.* 209: 139-155
- Schlecht S, Freudenberg MA, Galanos C (1997) Culture and biological activity of *Propionibacterium acnes*. *Infektion* 25: 247-249
- Schulz C, Gomez Perdiguero EG, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen SEW, Polalrd JW, Frampton J, Liu KJ, Geissmann F (2012) A lineage of myeloid cells independ of myb and hematopoietic stem cells. *Science* 336: 86-90
- Scott CL, Zheng F, De Baetselier P, Martens L, Saeys Y, De Prijck S, Lippens S, Abels C, Schoonoghe S, Raes G, Devoogt N, Lambrecht BN, Beschin A, Guilliams M (2016) Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. *Nat commun* 7:10321
- Shen FW, Saga Y, Litman G, Freeman G, Tung JS, Cantor H, Boyse EA (1985) Cloning of Ly-5 cDNA. *PNAS* 82: 7360-7363
- Sierro F, Evrard M, Rizzetto S, Melino M, Mitchel AJ, Florido M, Beattie L, Walters SB, Tay SS, Lu B, Holz LE, Roediger B, Wong YC, Warren A, Richtie W, McGuffog C, Weninger W, Le Couteur DG, Ginhoux F, Britton WJ, Heath WR, Saunders BM, McCaughan GW, Luciani F, MacDonald KPA, Ng LG, Bowen DG, Bertolino P (2017) A Liver Capsular Network of Monocyte-Derived Macrophages Restricts Hepatic Dissemination of Intraperitoneal Bacteria by Neutrophil Recruitment. *Immunity* 47: 374-388
- Sieweke MH, Allen JE (2013) Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. *Science* 342: 1242974-1-1242974-7
- Simkin J, Sammarco MC, Marrero L, Dawson LA, Yan M, Tucker C, Cammack A, Muneoka K (2017) Macrophages are required to coordinate mouse digit tip regeneration. *Development* 144(21): 3907-3916
- Singer JM, Adlersberg L, Hoenig EM, Ende E, Tchorsch Y (1969) Radiolabeled latex particles ithe investigation of phagocytosis in vivo: clearance curves and histological observations. *J Reticuloendothel Soc* 6: 561-589

- Soysa DR, Crispe IN (2016) Identify the differential response of Kupffer cell subsets during liver inflammation. *J Immunology* 196(1)
- Stefater JA, Lewkowich I, Rao S, Mariggi G, Carpenter AC, Burr AR, Fan J, Ajima R, Moltenkin JD, Williams BO, Wills-Karp M, Pollard JW, Yamaguchi T, Ferrara N, Gerhardt H, Lang RA (2011) Regulation of angiogenesis by a non-canonical Wnt-Flt1 pathway in myeloid cells. *Nature* 474: 511-515
- Su L, Li N, Tang H, Lou Z, Chong X, Zhang C, Su J, Dong X (2018) Kupffer cell-derived TNF- $\alpha$  promotes hepatocytes to produce CXCL1 and mobilize neutrophils in response to necrotic cells. *Cell Death Dis.* 9(3): 323
- Sudo T, Yokota T, Oritani K, Satoh Y, Sugiyama T, Ishida T, Shibayama H, Ezoe S, Fujita N, Tanaka H, Maeda T, Nagasawa T, Kanakura Y, Sun YY, Li XF, Meng XM, Huang C, Zhang L, Li J (2017) Macrophage Phenotype in liver injury and repair. *Scand J Immunol* 85(3): 166-174
- Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, Figuierto J-L, Kohler RH, Chudnovskiy A, Waterman P, Aikawa E, Mempel TR, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ (2009) Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites. *Science* 325(5940): 612-616
- Tacke F, Zimmermann HW (2014) Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *Journal of Hepatology* 60(5): 1090-1096
- Takahashi K, Yamamura F, Naito M (1989) Differentiation, maturation and proliferation of macrophages in the mouse yolk sac: a light-microscopic, enzyme-cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study. *J Leukoc. Biol* 45: 87-96
- Tomczyk M, Kraszewska I, Szade K, Bukowska-Strakova K, Meloni M, Jozkowicz A, Dulak J, Jazwa A (2017) Splenic Ly6C<sup>hi</sup> monocytes contribute to adverse late post-ischemic left ventricular remodeling in heme oxygenase-1 deficient mice. *Basic Res Cardiol.* 112(4): 39
- Trahtenberg U, Mevorach D (2017) Apoptotic Cells Induced Signaling for Immune Homeostasis in Macrophages and Dendritic Cells. *Frontiers in Immunology* 8: 1356
- Triantafyllou E, Pop OT, Possamai LA, Wilhelm A, Liaskou E, Singanayagam A, Bernsmeier C, Khamri W, Petts G, Dargue R, Davies SP, Tickle J, Yuksel M, Patel VC, Abeles RD, Stamataki, Z, Curbishley SM, Ma Y, Wilson ID, Coen M, Woollard KJ, Quaglia A, Wendon J, Thursz MR, Adams DH, Weston CJ, Antoniadou CG (2017) MerTK expressing hepatic macrophages promote the resolution of

inflammation in acute liver failure. *Gut* 0: 1-15

- Van Bossuyt H, Wisse E (1988) Structural changes produced in Kupffer cells in the rat liver by injection of lipopolysaccharide. *Hepatology* 251(1): 205-214
- van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, Langevoort HL (1972) The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bulletin of the World Health Organisation* 46: 845-852
- Virolainen M, (1968) Hematopoietic origin of macrophages as studied by chromosome markers in mice. *J Exp Med* 127: 943-952
- Willekens FLA, Werre JM, Kruijt JK, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Groenen-Döpp YAM, van den Bos AG, Bosman GJCGM, van Berkel TJC (2005) Liver Kupffer Cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood* 105: 2142-2145
- Wittmann A, Autenrieth IB, Frick J-S (2013) Plasmacytoid dendritic cells are crucial in *Bifidobacterium adolescentis*-mediated inhibition of *Yersinia enterocolitica* Infection. *PloS ONE* 8: e71338
- Wüstner D, Faergeman WJ (2008) Chromatic aberration correction and deconvolution for UV sensitive imaging of fluorescent sterols in cytoplasmic lipid droplets. *Cytometry Part A* 73(8): 727-744
- Wynn TA, Chawla A, Pollard JW (2013) Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496: 445-455
- Xu L, Yin W, Sun R, Wei H, Tian Z (2010) Kupffer cell-derived IL-10 plays a key role in maintaining humoral immune tolerance in hepatitis B virus-persistent mice. *Hepatology* 59(2): 443-452
- Yona S, Kim KW, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, Strauss-Ayali D, Viukov S, Guillams M, Misharin A, Hume DA, Perlman H, Malissen B, Zelzer E, Jung S (2013) Fate Mapping reveals origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity* 38:79-91
- Zigmond E, Samina-Grinberg S, Pasmanik-Chor M, Brazowski E, Shibolet O, Halpern Z, Varol C (2014) Infiltrating monocyte-derived macrophages and resident Kupffer cells display different ontogeny and functions in acute liver injury. *Journal of Immunology* 193(1): 344-353
- Zimmermann HW, Seidler S, Nattermann J, Gassler N, Hellerbrand C, Zerneck A, Tischendorf JW, Luedde T, Weiskirchen R, Trautwein C, Tacke F (2010) Functional Contribution of Elevated Circulating and Hepatic Non-Classical CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>

Monocytes to Inflammation and Human Liver Fibrosis. PLOS One 5(6) e11049.

## **7.2 Monographien**

Hopp A (2014) Transcriptional and functional insights of dendritic cell subsets in healthy liver and during induced liver injury. Masterarbeit, Saarbrücken

Kyono K (1914) Die vitale Karminspeicherung. Gustav Fischer Verlag, Jena

Metschnikoff I (2015) Immunität bei Infektionskrankheiten. Vero Verlag, Norderstedt

Vonnahme FJ (1993) The Human Liver – A Scanning Electron Microscopic Atlas. Karger GmbH, Minden

## **7.3 Beitragswerke**

Hardonk MJ, Van Goor H, Scherphof GL, Daemen T (1989) Functional heterogeneities between large and small Kupffer cells. In: Wisse E, Knook DL (ed). Cells of the Hepatic Sinusoid, Vol. 2. Rijswijk, The Kupffer Cell Foundation pp. 434-439

Langevoort, H. L. et al. (1970) The nomenclature of mononuclear phagocytic cells: proposal for a new classification. In: Furth, R. Van (ed) Mononuclear phagocytes. Oxford, Blackwell, pp. 1Ff

Reiser M (2009) Erkrankungen der Leber – Klinische Aspekte und Untersuchungsmethoden. In: Böhm M, Hallek M, Schmiegel W (ed) Innere Medizin. München, Elsevier, p. 945

Welsch U (2010) Präparationsmethoden. In: Welsch U, Mulisch M (ed) Romeis Mikroskopische Technik. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag, pp. 39ff

## 8. Danksagung

An der Anfertigung dieser Arbeit waren viele Menschen direkt und mittelbar beteiligt. Ihnen allen sei an dieser Stelle meine größte Dankbarkeit ausgesprochen.

Besonders erwähnen möchte ich Anna Nimmegern vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Universität des Saarlandes, die ich selbst mit vielen Sonderwünschen nicht aus dem Konzept bringen konnte und die mir mit ihrer Expertise und großen Präzision stets eine große Hilfe war. Weiterhin möchte ich mich bei Marion Schwarz vom Institut für experimentelle Neurochirurgie, vormals Institut für Anatomie für die großartigen Paraffinschnitte und die vielen hilfreichen Hinweise zur Präparation, die von großem Fachwissen zeugten, bedanken. Ein weiterer Dank gilt Reinhild Göbel aus dem Labor der Klinik für Innere Medizin, insbesondere für die Beteiligung an ihrem reichen Erfahrungsschatz.

Ann-Kathrin Hopp und Henrike Julich-Haertel danke ich für Anleitung und Hilfestellung in der Welt der Wissenschaft. Clara Müller möchte ich für kritische Anmerkungen und Kommentare sowohl technischer wie auch inhaltlicher Natur danken.

Darüber hinaus möchte ich meinen Eltern Sabine und Hans Helmut Eckert für die Ermöglichung des Studiums, ihren ausdauernden Zuspruch und ihre Unterstützung, sowie die präzise Korrektur der Arbeit danken. Die Möglichkeit, mich auf die Anfertigung dieser Arbeit zu fokussieren, verdanke ich nicht zuletzt auch meinen Großeltern Helmut und Gertrud Eckert, sowie Jürgen und Christel Keller, deren Unterstützung nicht hoch genug bewertet werden kann.

Dafür, dass sie mich während der Anfertigung dieser Arbeit mit großer Geduld und nahezu unendlichem Verständnis ertrug, und am Ende sogar noch die Ausdauer aufbrachte, meine Arbeit einer kritischen Korrektur zu unterziehen, möchte ich mich bei meiner Partnerin Caroline Bayer nachdrücklich bedanken.

Für seine treue Freundschaft, seinen wissenschaftlichen Rat und seine tatkräftige Unterstützung bei unzählbaren Gelegenheiten sei Niklas Klein meiner größten Dankbarkeit versichert.



Dr. Mirosław Kornek möchte ich für sein auch durch Rückschläge nicht zu schmälertes Engagement als kompetenter Berater, geduldiger Lehrer, brennender Motivator und leidenschaftlicher Wissenschaftler wärmstes Bedanken.

Tiefe Dankbarkeit möchte ich auch gegenüber Prof. Dr. Veronika Lukacs-Kornek ausdrücken, der ich nicht nur die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit verdanke, sondern auch weite Teile meines Wissens auf dem Gebiet der Immunologie.

Ihre Leidenschaft und ihre Neugierde, sowie ihre Bereitschaft unkonventionelle Wege zu gehen werden mir auf Dauer ein Vorbild sein. Ich möchte mich für ihre Geduld bedanken, für die Inspiration die sie mir in wissenschaftlicher wie menschlicher Sicht zu geben vermag und die vielen schönen Momente, die ich unter ihrer Anleitung erleben durfte.

# 9. Appendix

## Podoplanin discriminates distinct stromal cell populations and a novel progenitor subset in the liver

Christoph Eckert,<sup>1\*</sup> Yong Ook Kim,<sup>2\*</sup> Henrike Julich,<sup>1\*</sup> Eva-Carina Heier,<sup>1</sup> Niklas Klein,<sup>1</sup> Elmar Krause,<sup>4</sup> Thomas Tschernig,<sup>3</sup> Miroslaw Kornek,<sup>1</sup> Frank Lammert,<sup>1</sup> Detlef Schuppan,<sup>2</sup> and Veronika Lukacs-Kornek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Medicine II, Saarland University Medical Center, Homburg, Germany; <sup>2</sup>Institute of Translational Immunology and Research Center for Immunotherapy, University Medical Center, Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany; <sup>3</sup>Institute of Anatomy and Cell Biology, University of Saarland, Saarland, Germany; and <sup>4</sup>Department of Physiology, Center for Integrative Physiology and Molecular Medicine, University of Saarland, Saarland, Germany

Submitted 30 September 2015; accepted in final form 5 November 2015

**Eckert C, Kim YO, Julich H, Heier EC, Klein N, Krause E, Tschernig T, Kornek M, Lammert F, Schuppan D, Lukacs-Kornek V.** Podoplanin discriminates distinct stromal cell populations and a novel progenitor subset in the liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 310: G1–G12, 2016. First published November 12, 2015; doi:10.1152/ajpgi.00344.2015.—Podoplanin/gp38<sup>+</sup> stromal cells present in lymphoid organs play a central role in the formation and reorganization of the extracellular matrix and in the functional regulation of immune responses. Gp38<sup>+</sup> cells are present during embryogenesis and in human livers of primary biliary cirrhosis. Since little is known about their function, we studied gp38<sup>+</sup> cells during chronic liver inflammation in models of biliary and parenchymal liver fibrosis and steatohepatitis. Gp38<sup>+</sup> cells were analyzed using flow cytometry and confocal microscopy, and the expression of their steady state and inflammation-associated genes was evaluated from healthy and inflamed livers. Gp38<sup>+</sup> cells significantly expanded in all three models of liver injury and returned to baseline levels during regression of inflammation. Based on CD133 and gp38 expression in the CD45<sup>−</sup>CD31<sup>−</sup>Asgpr1<sup>−</sup> liver cell fraction, numerous subsets could be identified that were negative for CD133 (gp38<sup>hi</sup>CD133<sup>−</sup>, gp38<sup>low</sup>CD133<sup>−</sup>, and gp38<sup>−</sup>CD133<sup>−</sup>). Moreover, among the CD133<sup>+</sup> cells, previously identified as progenitor population in injured liver, two subpopulations could be distinguished based on their gp38 expression (gp38<sup>−</sup>CD133<sup>+</sup> and CD133<sup>+</sup>gp38<sup>+</sup>). Importantly, the distribution of the identified subsets in inflammation illustrated injury-specific changes. Moreover, the gp38<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> cells exhibited liver progenitor cell characteristics similar to the gp38<sup>−</sup>CD133<sup>+</sup> population, thus representing a novel subset within the classical progenitor cell niche. Additionally, these cells expressed distinct sets of inflammatory genes during liver injury. Our study illuminates a novel classification of the stromal/progenitor cell compartment in the liver and pinpoints a hitherto unrecognized injury-related alteration in progenitor subset composition in chronic liver inflammation and fibrosis.

fibrosis; NASH; inflammation; oval cells

CHRONIC LIVER DISEASES OFTEN lead to extensive cellular damage, fibrosis, and ultimately to cirrhosis and organ failure. While hepatocytes provide the major source for liver regeneration, liver damage is accompanied by extensive progenitor cell expansion (7). These cells termed oval cells are quiescent at steady state and emerge in the portal or periportal area during injury (7, 27, 30, 38, 49). They exhibit bipotential differentia-

tion capacity and are able to give rise to both hepatocytes and cholangiocytes in vitro (7, 9, 38, 39) and in vivo (39, 42). However, genetic tracing of Foxl1<sup>+</sup> (39) and Sox9<sup>+</sup> (42) oval cells indicated that these cells do not contribute significantly to hepatocyte regeneration in vivo, demonstrating an undetermined role of progenitor cell expansion during liver injury. Multiple studies have tried to identify the unequivocal cellular and molecular characteristic of oval cells (6–9, 27), and a variety of markers such as CD45, CD133, CD90, CD34, and CD326 were associated with these cells. Many of these markers are corresponding to hematopoietic stem cells or mesenchymal progenitor cells suggesting a heterogeneous population of precursors identified as oval cells within the liver. Despite of extensive studies, using primarily histology and PCR analyses, the characteristic marker combinations and molecular signatures remain elusive (7).

Gp38/podoplanin<sup>+</sup> nonhematopoietic cells called stromal cells are present in secondary lymphoid organs (SLOs) and play central role in the formation and reorganization of the extracellular matrix providing the three-dimensional scaffold for immune responses (44). Additionally, they produce cytokines/survival factors for immune cell homeostasis and guide the migration and cellular interaction of immune cells within lymphoid organs (24). Moreover, gp38<sup>+</sup> stromal cells are crucial in the functional regulation of T- and B-cell responses during immunity (4, 23). Importantly, gp38<sup>+</sup> cells similar to the ones present in SLOs have been identified in nonlymphoid organs associated with chronic inflammation where they are building elements of tertiary lymphoid structures (TLS) (29, 45). In the liver, such a CCL21<sup>+</sup> reticular network of TLS built by gp38<sup>+</sup> stromal cells has been recently identified in human primary biliary cirrhosis (21). Additionally, gp38<sup>+</sup> cells emerge during liver embryogenesis (16, 17) and in adult liver as part of the lymphatics and the mesothelium and in low abundance in the luminal part of bile duct (19, 22). Nevertheless, little is known about the function of these cells, especially in the adult liver.

Thus we aimed to study the phenotypic and functional characteristics of gp38<sup>+</sup> cells at steady state and during chronic liver inflammation. Using a novel isolation technique and analysis of gp38<sup>+</sup> cells, we determined multiple subsets of nonhematopoietic/stromal cells of the liver that represent components of the progenitor cell response during liver injury. Moreover, we could identify differences in the responding subsets dependent on the type of injury and in the expression of inflammation associated genes, suggesting a hitherto unrec-

\* C. Eckert, Y. O. Kim, and H. Julich contributed equally to this work.

Address for reprint requests and other correspondence: V. Lukacs-Kornek, Dept. of Medicine II, Saarland Univ. Medical Center, Homburg, Germany (e-mail: lukacsver@aol.com).

ognized division of labor within the hepatic progenitor cell compartment.

## MATERIALS AND METHODS

**Mice.** Mice were obtained from Charles River (Sulzfeld, Germany) or Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). MDR2<sup>-/-</sup> animals were maintained under specific pathogen free conditions at the Helmholtz Centre for Infection Research (Braunschweig, Germany) or at the Translational Animal Research Center (Mainz, Germany). Animals were transported to Homburg and housed in pathogen free conditions in an assigned mouse cabinet (Bioscape, Castrop-Rauxel, Germany) in the Institute of Internal Medicine II (Saarland University, Homburg, Germany). All experimental procedures were conducted with the approval of the ethics and animal care committees of Homburg and Mainz University Medical Centers. Mice received CCl<sub>4</sub> as described previously (35) for 3 or 6 wk (fibrosis progression), or CCl<sub>4</sub> was stopped after 6 wk and mice were killed 1 wk later (regression phase). Seven- to eight-week-old C57Bl/6 male mice were fed methionine and choline-deficient (MCD) (catalog no. A02082002B) or control (CD) (catalog no. A02082003B) diet for 5 wk (Research Diets, New Brunswick, NJ). Control diet contained identical ingredients as the MCD diet, except it was methionine and choline sufficient (Research Diets). Subgroup of animals received the CD for 1 wk after termination of the MCD diet (regression phase).

**Statistics.** For statistical analyses Prism 5 (Graphpad Software) was used. Data were compared using an unpaired two-tailed *t*-test or one-way ANOVA using Bonferroni posttest (\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.005, and \*\*\**P* < 0.0001).

**Preparation of liver single cell suspension.** The liver was perfused (5 ml/min) through the portal vein with digestion buffer [RPMI containing 0.1 mg/ml DNase-I (Life Technologies, Darmstadt, Germany), 0.2 mg/ml collagenase P (Roche, Mannheim, Germany), and 0.8 mg/ml Dispase (Roche)] until the liver turned light. The liver was removed, cut into small pieces, and digested for 60–80 min at 37°C. During this time period the digestion was interrupted as follows: at 5–10 and 15 min, samples were mixed by agitating the tubes; at 20 and at 30 min, samples were mixed using 1,000- $\mu$ l pipette tip where the tip was cut to allow larger pieces to pass through. At 45 min, noncut pipette tips were used. (For fibrotic samples additional mixing step was performed using noncut pipette tips.) Then, samples were mixed every 5 min using uncut pipette tips until the liver was completely digested. After each mixing step, organ pieces were allowed to settle down and supernatant, containing dissociated cells were collected, centrifuged and resuspended in RPMI with 2 mM EDTA 1% FCS, and filtered (100- $\mu$ m mesh), and red blood cells were lysed using ACK lysis buffer (Life Technologies).

**Flow cytometry of liver cells.** Cells were counted using a MacsQuant Analyzer (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Cell debris and doublets were gated out using FSC-A vs. SSC-A and FSC-A vs. FSC-H gates, respectively. Dead cells were distinguished using DAPI (Life Technologies) or propidium iodide (PI; Miltenyi Biotec). Then,  $5 \times 10^5$  living, single cells were stained in FACS buffer (MacsQuant Running solution; Miltenyi Biotec). First, cells were resuspended in 50  $\mu$ l FACS buffer containing murine Fc-block solution (10  $\mu$ l/staining; Miltenyi Biotec) and anti-CD64 antibody (clone: X57-5/7.1, 1:100; Biolegend, San Diego, CA) and incubated for 5 min on ice, followed by the addition of antibodies to various surface markers in 50  $\mu$ l buffer and incubation for further 20 min on ice. Samples were washed and measured using a MacsQuant Analyzer (Miltenyi) or FACS Aria III (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). For intracellular labeling, cells were fixed, permeabilized, and stained using the Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences), following the manufacturer's guidelines. Data were analyzed using FlowJo 10.0.7 software (FlowJo, Ashland, OR).

**Flow cytometry sorting of stromal cell subsets.** Liver single cell suspensions were prepared as described above. Progenitor cells were

enriched using magnetic beads as follows:  $2 \times 10^7$  cells excluding debris via FSC-A vs. SSC-A gate were resuspended in 400  $\mu$ l MACS buffer (Automacs Running buffer containing 0.1% BSA; Miltenyi Biotec) and incubated with 10  $\mu$ l CD133 microbeads (Miltenyi Biotec) at 4°C for 15 min. In some cases, cells were resuspended in 400  $\mu$ l MACS buffer containing mouse Fc block solution and anti-CD64 antibody and incubated on ice for 5 min, followed by surface staining of gp38 (clone: 8.1.1; Biolegend). Then samples were washed and resuspended in 400  $\mu$ l MACS buffer containing 10  $\mu$ l anti-APC microbeads (Miltenyi Biotec) and incubated at 4°C for 15 min. Respective fractions were enriched by an AutoMACS Cell Separator (Miltenyi Biotec) using the possel(s) program, according to the manufacturer's instructions. Cells were counted, stained, and sorted using FACS Aria III (BD Biosciences) fitted with an 85- $\mu$ m nozzle and at a pressure not exceeding 45 psi. Two healthy and one or two diseased livers were pooled for sorting 4,000–7,000 cells of each progenitor subset first in DMEM (Life Technologies) containing 20% FBS and then directly in RLT or RLT plus buffer (Qiagen, Hilden, Germany) and stored at –80°C until further use. Purity of sorted populations routinely exceeded 85–90%.

**Antibodies and reagents.** Cells were stained using the following antibodies: CD45 (30-F11), gp38 (8.1.1), CD31 (MEC13.3), Epcam-1 (G8.8), CD90.2 (53-2.1), CD117 (2B8), CD105 (YN1/1.7.4), CD106 (429), CD26 (H194-112), CD133 (315-2C11), and CD157 (BP-3) were purchased from Biolegend (San Diego). CD133 (MB9-3G8), CD90.1 (His51), and Sca-1 (D7) were acquired from Miltenyi Biotec. CD34 (RAM34) and G-SCF (9B4CSF) were obtained from eBioscience (Frankfurt, Germany) while M6a (321) from MBL (Woburn, MA). Additionally, desmin was from Abcam (Cambridge, UK), and CCL21, CCL19, Asgpr1, TSG-6, and Pref-1 were from Bio-Techne (Minneapolis, MN). All secondary antibodies (anti-rabbit/anti-goat/anti-hamster/anti-rat labeled with either Alexa-488, Alexa-647 or Alexa-555) were obtained from Life Technologies.

**Quantitative PCR analyses.** Cells were lysed in RLT or RLT plus buffer (Qiagen), snap-frozen, and stored at –80°C. RNA extraction, RNA amplification, and custom qPCR array (array ID: CAPM13093) analyzes were performed at Qiagen. Raw data provided by Qiagen were analyzed in house. For some sorted samples RNA was prepared using Qiagen RNeasy/plus kit and first-strand cDNA synthesis was performed using QuantiTect reverse transcription kit (Qiagen) according to the manufacturer guidelines. qPCR was carried out with validated primers in 10- $\mu$ l reactions using the Fast SYBR Green qPCR reagent (Life Technologies) and the following program: 50°C for 2 min, 95°C for 2 min, and 40 cycles of amplification at 95°C for 15 s and 60°C for 45 s. Relative levels of target mRNA were compared with  $\beta_2$ -microglobulin using the 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>T</sub></sup> method. Primers were purchased from Bio-Rad (München, Germany) or from Qiagen.

**Immunofluorescent staining of frozen tissue sections.** Livers were fixed in 4% PFA in PBS for 4 h followed by a 4-h incubation in PBS containing 15% sucrose and overnight incubation in PBS containing 30% sucrose at 4°C. Tissue was snap frozen in OCT media (Thermo Fischer Scientific, Waltham MA) on dry ice. Seven-micrometer-thick cryosections were air-dried and fixed with 2% PFA for 10 min, followed by a 30-min incubation with Image-iT FX signal enhancer (Life Technologies). Unspecific binding was blocked by PBS containing 3% BSA or BlockAid blocking solution (Life Technologies) for 1–2 h. In some cases, endogenous biotin was blocked by using the biotin-blocking system (Dako, Hamburg, Germany) before the blocking step according to manufacturer guidelines. Samples were stained with primary antibodies and secondary antibodies in 3% BSA in PBS or in BlockAid blocking solution for 1 h and then were washed three times with 0.01% Tween in PBS. For staining of cell nuclei, cells were incubated with PBS containing DAPI (1:1,000; Life Technologies) for 20 min. Samples were washed three times with PBS and covered with Fluorescence mounting medium (Dako, Hamburg Germany). Samples were imaged using LSM 780 Zeiss laser scanning confocal micro-

scope. Images were analyzed using Zen (Zeiss) or ImageJ 1.46r software (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

**RESULTS**

*Gp38<sup>+</sup> stromal cells are present in healthy liver and expand during chronic liver injury.* In stromal biology, nonhematopoietic (CD45<sup>-</sup>) cells are collectively referred to as stromal cells (23). In the article, we refer to stromal cells as nonhematopoietic cells where endothelial cells (CD31<sup>-</sup>) and hepatocytes (asialoglycoprotein receptor 1 negative, *Asgpr1*<sup>-</sup>) are additionally excluded. To study podoplanin positive (gp38<sup>+</sup>) stromal cells in the liver, we established a novel digestion method for liver similar to the one used for lymph node stromal cells (23). Importantly, gp38<sup>+</sup> cells were readily detectable in healthy livers and represented up to 0.3–0.5% of CD45<sup>-</sup> living cells (Fig. 1, A and B). To assess how gp38<sup>+</sup> cells are altered during liver inflammation, their presence was analyzed in various chronic liver injury models, i.e., spontaneously progressive

biliary fibrosis, CCl<sub>4</sub>-induced fibrosis and a model of nonalcoholic steatohepatitis (MCD diet). The percentage and absolute number of gp38<sup>+</sup> cells increased significantly in all three injury models (Fig. 1, B and C). Moreover, when liver inflammation ceased during resolution, the amount of gp38<sup>+</sup> cells decreased but was still increased in the CCl<sub>4</sub> model and comparable to healthy values in MCD model (Fig. 1, B and C). The reduction of gp38<sup>+</sup> cells in the CCl<sub>4</sub> model during regression has been associated with early inflammatory response that decreases after 1 wk while scar resolution extends for a longer period of time (15). These data overall indicate a strong association between the presence of gp38<sup>+</sup> cells and liver inflammation.

Next, we sought to understand where gp38<sup>+</sup> cells localize during liver injury. As previously demonstrated, healthy liver exhibited strong podoplanin expression in the capsular area that was previously identified as mesothelium (19, 22) (Fig. 2A). Within the liver parenchyma, gp38<sup>+</sup> cells in healthy liver

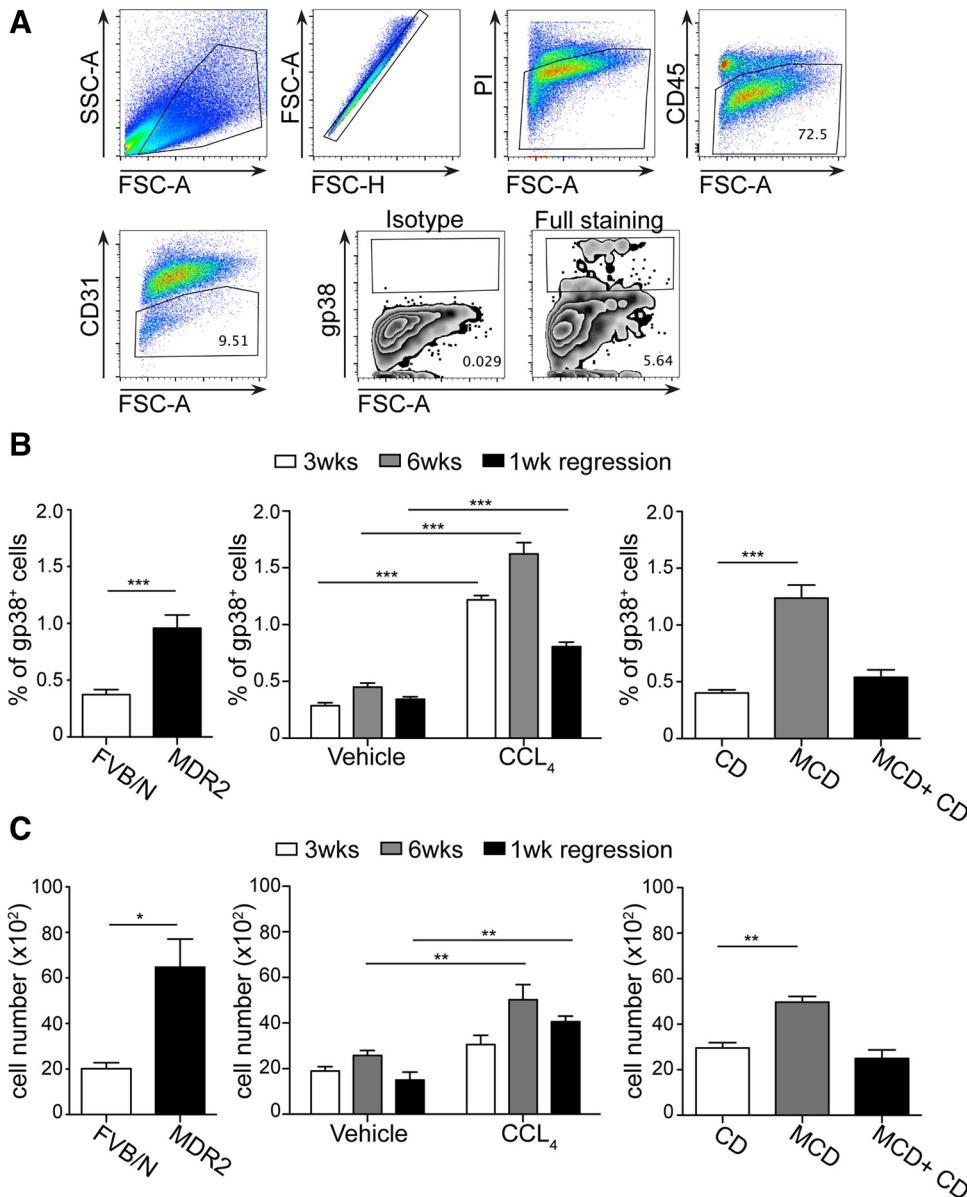


Fig. 1. Gp38<sup>+</sup> stromal cells are present in healthy liver and expand during chronic liver injury. A: single cell suspension was prepared from healthy livers and subsequently stained with a panel of surface markers: CD45, CD31, and gp38. For dead cell exclusion propidium iodide (PI) was utilized. Representative dot plots with gating strategy are depicted. B: percentages of gp38<sup>+</sup> stromal cells present among the CD45-negative cells in control animals and in chronic liver injuries. C: absolute numbers of gp38<sup>+</sup> cells were calculated within 10<sup>6</sup> living cells. FSC, forward scatter; SSC, scatter. Data are means ± SE. Data in A–C represent 2–3 independent experiments with n = 3–4 per experiment. \*P < 0.05, \*\*P < 0.005, and \*\*\*P < 0.0001.

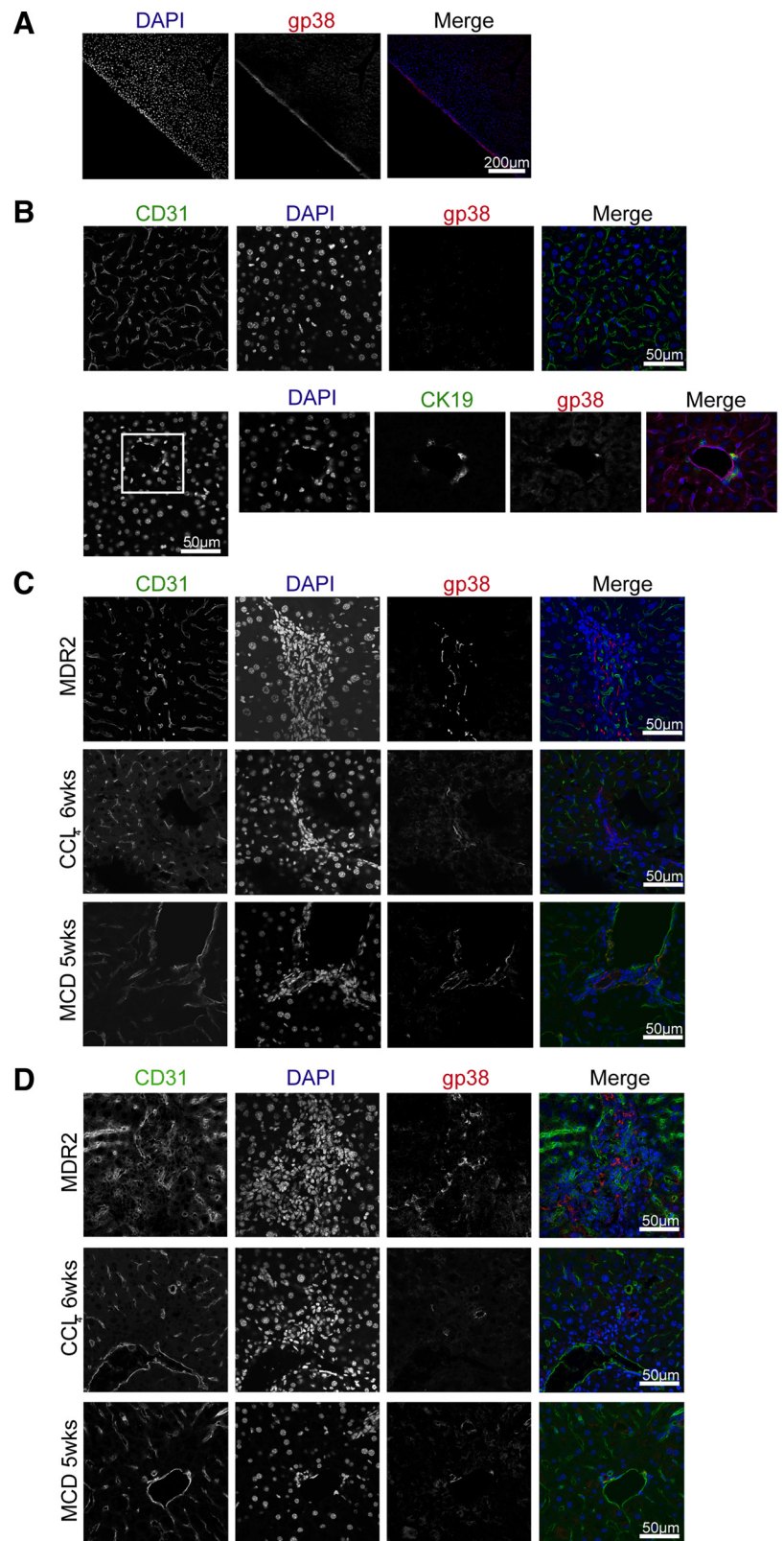


Fig. 2. Gp38<sup>+</sup> stromal cells localizes at cell dense structures of the injured liver. Healthy (A and B) or injured (C and D) livers were removed, preprocessed, and snap frozen. Cryosections were prepared and stained for gp38, CD31, and DAPI. Images were recorded using  $\times 20$  (B) or  $\times 40$  (A, C, and D) objectives. Scale bar = 200  $\mu\text{m}$  (B) or 50  $\mu\text{m}$  (A, C, and D). B, bottom: white square pinpoint area that were zoomed in. Data are representative of 2 independent experiments,  $n = 3$  mice per group and 1 mold per organ per mouse. From each mold multiple sections were analyzed in 100- to 300- $\mu\text{m}$  distances within the tissue. MCD, methionine and choline-deficient diet.

could rarely be identified (Fig. 2B) but were detected during liver injury in the liver parenchyma where they typically localized in cell dense areas defined by closely packed DAPI<sup>+</sup> cells (Fig. 2C). Such cell-dense regions were mostly close to

the portal or periportal area (Fig. 2C) and contained various inflammatory cells (data not shown). This localization was prevalent in all three liver injury models but most prominent in MDR2-deficient animals (Fig. 2C). Moreover, within these

structures CD31<sup>+</sup>gp38<sup>+</sup> lymphatic endothelial cells could be identified in the absence of high endothelial venules (data not shown), suggesting that these cell-dense areas are not associated with classical tertiary lymphoid structures as identified in other organs (45). Furthermore, occasionally, gp38<sup>+</sup> cells appeared as ductular structures within the parenchyma in all liver injury models investigated (Fig. 2D).

*Podoplanin and CD133 define a heterogeneous population of nonhematopoietic stromal cells.* Closer evaluation of gp38 expression detected via flow cytometry demonstrated two different levels of signal intensity determining a population with low and another population with high expression level of gp38 in healthy liver (Fig. 1A). To further establish whether cells with different podoplanin expression indicate phenotypically divergent subsets, additional surface markers were evaluated. With the use of gp38 together with anti-CD133, a marker associated with progenitor cells in chronic inflammation (38), multiple subsets could be distinguished among CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>Asgpr1<sup>-</sup> living cells: gp38<sup>hi</sup>CD133<sup>-</sup>, gp38<sup>low</sup>CD133<sup>-</sup>, and gp38<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> (Fig. 3A). Moreover, a fourth population of cells expressing CD133 but not gp38 (gp38<sup>-</sup>CD133<sup>+</sup>) and a fifth population that was negative for both markers (gp38<sup>-</sup>CD133<sup>-</sup>) (Fig. 3A) were identified. Thus the flow cytometry analyses indicated that among the CD133<sup>+</sup> cells, previously identified as progenitor/oval cells, a novel subpopulation could be separated expressing gp38<sup>+</sup> (Fig. 3A) (38).

Since the strongest podoplanin expression in microscopy images could be detected in the capsular area of the healthy liver (Fig. 2A), we studied whether the gp38<sup>hi</sup> cells (gp38<sup>hi</sup>CD133<sup>-</sup>) in the flow cytometry analyses could represent this cell population. Indeed, gp38<sup>hi</sup> cells could not be detected when liver was digested without the capsule (Fig. 3B). Additionally, only these cells were positive for the mesothelial marker glycoprotein M6a(19, 22) (Fig. 3C). Thus the gp38<sup>hi</sup>CD133<sup>-</sup> cells represent the mesothelium in the single cell suspension.

To further ascertain phenotypical differences among podoplanin positive cells and their relation to the CD133<sup>+</sup> oval cells, liver samples were tested for the expression of various surface molecules associated with mesenchymal stem and liver precursor cells under steady state. Evidently, all subsets expressed the mesenchymal marker CD26 while mesothelial cells, appearing as gp38<sup>hi</sup> cells, exclusively expressed CD90 and CD157 (Fig. 3D and Table 1). Moreover, gp38<sup>low</sup>CD133<sup>-</sup> cells were the only subset that expressed low levels of CD34 (hematopoietic stem cell marker) and was associated with the highest expression of Sca-1 (Fig. 3D and Table 1). The gp38<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> population was negative or expressed lower levels of all above-mentioned markers (Fig. 3D and Table 1) but represented the highest CD326 (EpCAM) expressing cell population. As expected the gp38<sup>-</sup>CD133<sup>+</sup> cells were similar to gp38<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> but showed a lower expression of CD326 and were negative for the mesenchymal marker CD105 and for CD106 (VCAM; Fig. 3D and Table 1). Except for CD26, gp38<sup>-</sup>CD133<sup>-</sup> cells did not express any of the mesenchymal or progenitor-related surface markers investigated, thus representing the least characterized stromal population. In summary, gp38<sup>hi</sup>CD133<sup>-</sup> cells are mesothelial cells, the gp38<sup>low</sup>CD133<sup>-</sup> cells represent cells expressing mesenchymal and precursor-associated molecules, and gp38<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> cells seem to be a

subpopulation of the classical oval cell compartment previously identified as CD133<sup>+</sup> cells (7).

*Subset distribution during liver inflammation reveals injury specific differences.* To assess the contribution of the above-described subsets in the overall increase of the gp38<sup>+</sup> population found in liver injury (Fig. 1, B and C), we determined the individual changes in each gp38<sup>+</sup> group. The subset that increased in all three liver injury models was the gp38<sup>+</sup>CD113<sup>+</sup> population (Fig. 4A). These cells seemed to be a subpopulation of CD133<sup>+</sup> cells (Fig. 3, A and D) previously identified as liver progenitors (38). Notably, the gp38<sup>-</sup>CD113<sup>+</sup> population increased in liver injury albeit only significantly in the CCl<sub>4</sub> and MCD models (Fig. 4, A and B). The increased frequencies of both cell populations during CCl<sub>4</sub> treatment were accompanied by elevated expression of CD326 (Fig. 4, C and D). In contrast, MDR2 KO mice did not show a significant increase in the frequency of gp38<sup>-</sup>CD113<sup>+</sup> cells and rather demonstrated a decrease in CD326 (EpCAM) expression in this cell population compared with wild-type controls (Fig. 4D). Additionally, the frequency of gp38<sup>low</sup>CD113<sup>-</sup> cells and their CD326 expression were highly elevated, suggesting the presence of a specific inflammatory milieu selectively favoring the expansion of this subpopulation in this type of biliary fibrosis (Fig. 4, E and F). In accordance with this, the frequency of the gp38<sup>low</sup>CD113<sup>-</sup> population was largely unaltered in the other two models of liver inflammation despite an elevated CD326 expression in CCl<sub>4</sub>-mediated liver injury (Fig. 4F). In accordance with analyses in healthy animals (Fig. 3D), the expanding gp38<sup>low</sup>CD113<sup>-</sup> population in MDR2-deficient animals represented Sca-1<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> cells and additionally contained cells positive for the cholangiocytes/progenitor differentiation marker CK19 (data not shown).

*Gp38<sup>+</sup>CD113<sup>+</sup> cells exhibit oval cell characteristics.* Since gp38<sup>+</sup> cells have been identified in the CD133<sup>+</sup> cell compartment that were identified as progenitor/oval cells in injured liver, we next investigated whether the gp38<sup>+</sup>CD113<sup>+</sup> subpopulation exhibit similarities to CD133<sup>+</sup> oval/progenitor cells. To this end, gp38<sup>+</sup>CD113<sup>+</sup> and gp38<sup>-</sup>CD113<sup>+</sup> cell populations were sorted from healthy liver and further characterized by qPCR analyses of oval cell-related genes. Accordingly, gp38 was expressed only in the gp38<sup>+</sup>CD113<sup>+</sup> cell and was missing in the gp38<sup>-</sup>CD113<sup>+</sup> population, while CD133 (Prom1) was present in both populations underlining the purity of the samples on the genetic level (Fig. 5A). Interestingly, transcription factors associated with oval cells such as FoxJ1 and Sox9 could be detected in both cell types. Additional genes associated in previous studies with bipotential progenitor/oval cells such as albumin (Alb), alpha-fetoprotein (Afp), and cytokeratin 7 and 19 (Krt7, Krt19) were also equally present in both group of cells (Fig. 5A). Moreover, aldehyde dehydrogenase (Aldh1a1), an enzyme that activity enriched progenitor cells in healthy liver (6), and all tested genes involved in multiple pathways associated with stem/progenitor cell differentiation or maintenance such as members of the Notch, Wnt, hedgehog, and Hippo pathways (11, 47) could be detected equally in both cell types in healthy liver (Fig. 5, A and B), indicating that both population belongs to the oval/progenitor compartment previously identified as CD133<sup>+</sup> cells in the liver (7, 8, 38).

As gp38<sup>+</sup> stromal cells in secondary lymphoid organs and in nonlymphoid organs express a high level of homeostatic chemokines (24), we sought to determine whether their pres-

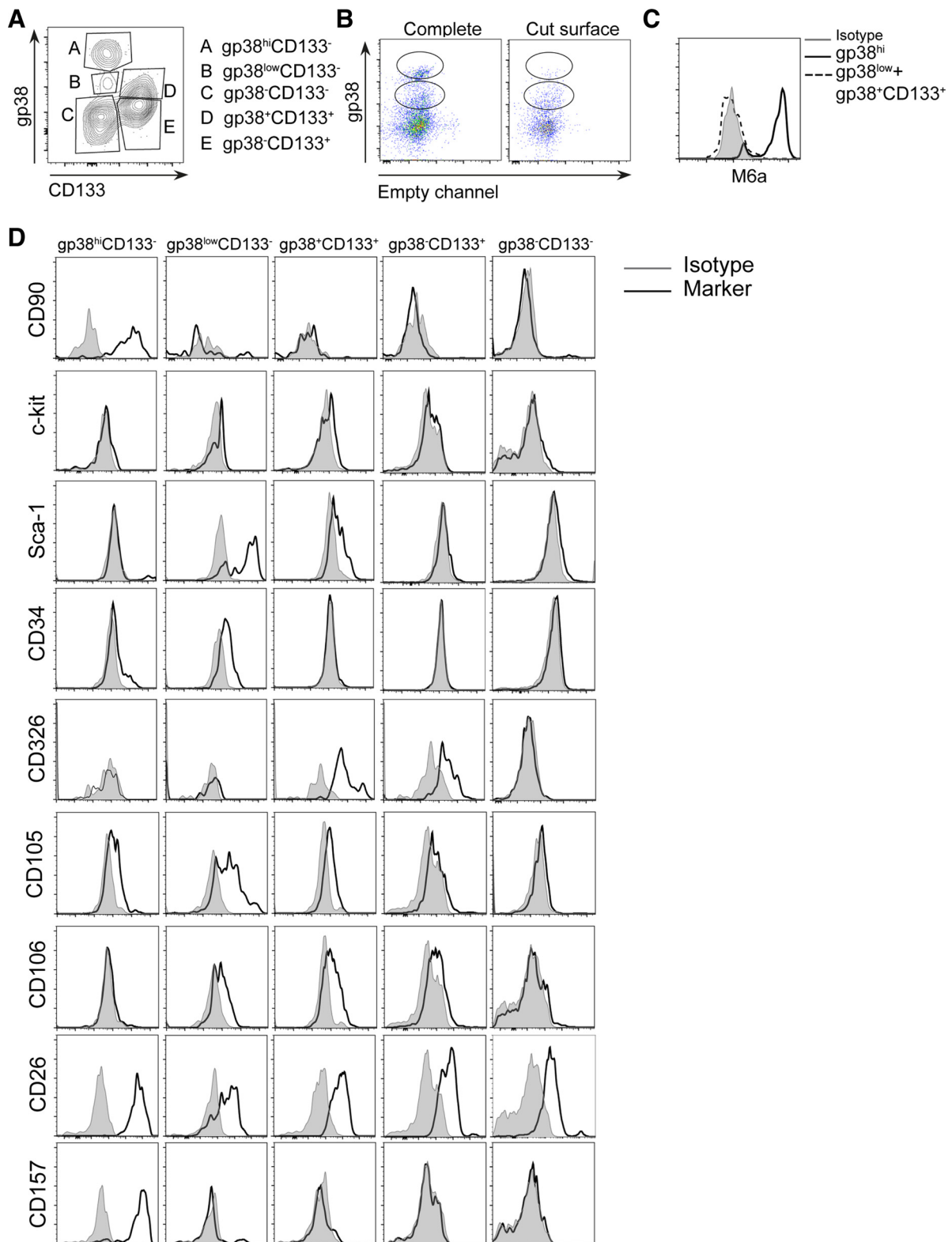


Fig. 3. Podoplanin and CD133 define a heterogeneous cell population consisting of multiple subsets. *A*: liver single cell suspension was stained with PI, CD45, CD31, Asgpr1, gp38, and CD133. Representative dot plot is displayed of PI<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>Asgpr1<sup>-</sup> cells. *B*: total liver and liver without the external capsule (cut surface) were digested and stained for PI and gp38. Dot plot depicts PI<sup>-</sup> cells. *C*: liver cells were stained with PI, gp38, and M6a. Representative histograms are shown. *D*: liver was stained as in *A* and with 1 of the depicted surface markers. Representative histograms are shown. Data in *A–D* represent 3 independent experiments with  $n = 3–4$  per experiment.



Table 1. Summary of surface markers

Markers	gp38 <sup>hi</sup> CD133 <sup>-</sup>	gp38 <sup>low</sup> CD133 <sup>-</sup>	gp38 <sup>+</sup> CD133 <sup>+</sup>	gp38 <sup>-</sup> CD133 <sup>+</sup>	gp38 <sup>-</sup> CD133 <sup>-</sup>
CD90	+++	-	-	-	-
CD117	-	-	-	-	-
Sca-1	-	+++	+	-	-
CD34	-	+	-	-	-
CD326	-	-	+++	++	-
CD105	+	++	+	-	-
CD106	-	+	+	-	-
CD26	++	++	++	++	++
CD157	+++	-	-	-	-

+++ : High expression level; ++ : moderate expression level; + : low expression level; - : negative expression.

ence would be associated with the expression of gp38<sup>+</sup> stromal cell-related chemokines CCL19 and CCL21 (24) also in the liver. Notably, none of the populations expressed these two chemokines in the liver, while as expected CCL21 expression was detected in lymphatic endothelial cells of normal livers (data not shown). Thus gp38<sup>+</sup>CD113<sup>+</sup> and gp38<sup>-</sup>CD113<sup>+</sup> display oval/progenitor characteristic and differ from lymph node stromal cells.

The gp38<sup>+</sup>CD113<sup>+</sup> subpopulations demonstrate differences in genes related to inflammation. Gp38 separated the CD133<sup>+</sup> population into two subsets (Fig. 3A). Accordingly, the gp38<sup>+</sup>CD113<sup>+</sup> cells showed alterations in their frequency in all injury models investigated and seemed to change together with the gp38<sup>-</sup>CD113<sup>+</sup> cells (Fig. 4, A–D). To determine whether the new subpopulation (gp38<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>) functionally differs from the main oval/progenitor population

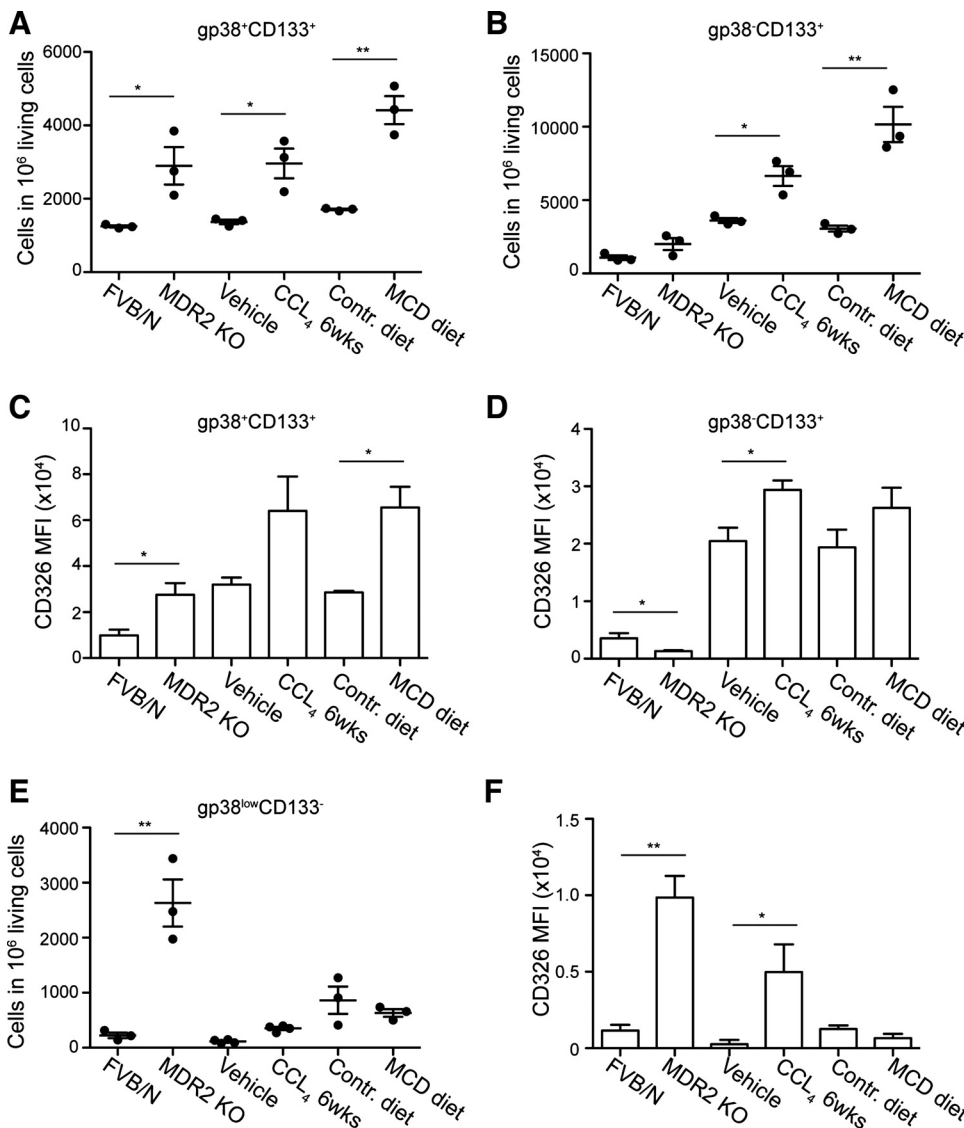


Fig. 4. Subset distribution during liver inflammation reveals injury specific differences. Liver from healthy animals was digested and single cell suspension was prepared. Cells were stained with PI, CD45, CD31, gp38, and CD133. The absolute numbers of the gp38<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> (A), gp38<sup>-</sup>CD133<sup>+</sup> (B), and gp38<sup>low</sup>CD133<sup>-</sup> (E) are depicted within 10<sup>6</sup> living cells present in the single cell suspension of control and injured livers. The median fluorescence intensity of CD326 expression is depicted for the gp38<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> subset (C), for the gp38<sup>-</sup>CD133<sup>+</sup> cells (D), and for the gp38<sup>low</sup>CD133<sup>-</sup> cells (F). Data are means ± SE. Data in A–F represent 2–3 independent experiments with n = 3–4 per experiment. \*P < 0.05 and \*\*P < 0.005.

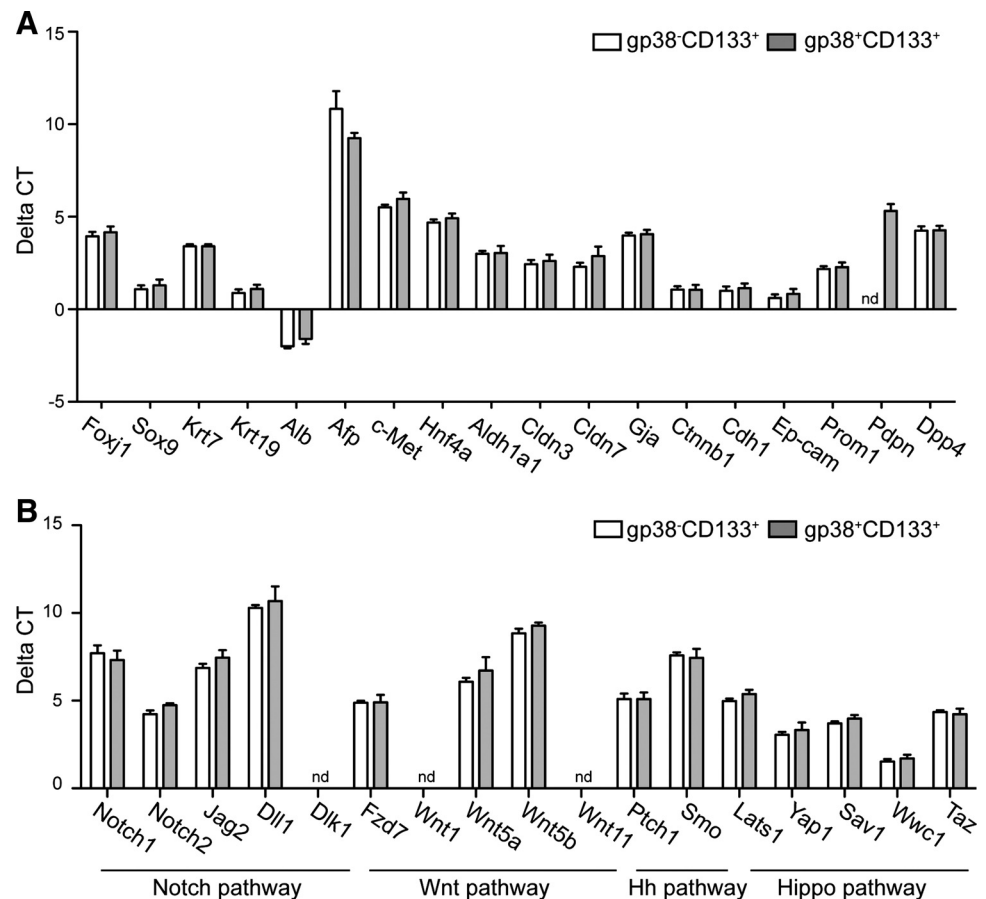


Fig. 5. gp38<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> cells exhibit oval cell characteristics. gp38<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> and gp38<sup>-</sup>CD133<sup>+</sup> subsets were sorted with high purity, RNA and cDNA were prepared and qPCR was performed. Graph depicts the  $\Delta C_T$  values of each subset compared with its housekeeping gene ( $\beta_2$ -microglobulin)  $\pm$  SE for the listed genes. A: progenitor-related genes. B: various signaling pathway-associated genes. From each subset 3 independent samples were sorted and processed.

(gp38<sup>-</sup>CD133<sup>+</sup>) (7, 8, 38), high purity sort of these populations was performed from healthy and CCl<sub>4</sub>-treated animals. Importantly, not short-term injection of CCl<sub>4</sub>, but chronic CCl<sub>4</sub> treatment-induced liver fibrosis demonstrated the presence of oval/progenitor cells in previous studies (18, 36). Indeed, in the two cell populations genes related to oval cells remained similar with and without CCl<sub>4</sub> treatment, and only Afp levels were upregulated in both populations (data not shown). The expression levels of genes related to the Notch, Hh, or Wnt pathways were largely unchanged between cells from control vs. fibrotic mice except Wnt5a, Wnt5b, and Dll1, which showed a modest upregulation in both cell populations, while in DPs Ikbkg (Nemo) was slightly repressed (Fig. 6A). Dlk1 (Pref-1), previously associated with hepatocyte differentiation in embryonic liver (41), was markedly upregulated in gp38<sup>-</sup>CD133<sup>+</sup> but only moderately increased in gp38<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> cells (Fig. 6A). When histology sections were investigated, Pref-1 protein was detected in cell-dense structures during CCl<sub>4</sub> injury in line with the mRNA data (Fig. 6C).

Since oval cell proliferation is associated with the activation of multiple inflammatory signaling pathways (11) and the direction of their differentiation is greatly influenced by myeloid cells (1), inflammation-related cytokines and growth factors were evaluated. Both groups expressed Csf1, Cxcl10, Spp1, and Flt3L and modestly upregulated Ctgf and CXCL16 in injury (Fig. 6B), all of which are molecules involved in cellular growth, in differentiation, and in the recruitment of immune cells (24, 44). Notably, upon injury CCL2 mRNA was nearly 60-fold increased in both cell types suggesting a strong association of these progenitor cells with monocyte and mac-

rophage recruitment (Fig. 6B). In addition to this, TNF, an important inflammatory mediator was largely upregulated by gp38<sup>-</sup>CD133<sup>+</sup> cells (~300 fold) and showed just an ~10-fold increase on RNA level in the gp38<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> cell population (Fig. 6B). As opposite to this, TNF $\alpha$ -induced protein-6 (TSG-6), an anti-inflammatory molecule(3), and Csf3 (G-CSF) were selectively upregulated in gp38<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> cells and were not expressed by the other population, indicating its selective role in inflammation. Consequently, at the protein level, G-CSF and TSG-6 could be detected within the liver parenchyma (Fig. 6C).

## DISCUSSION

Emerging evidence suggests that gp38<sup>+</sup> stromal cells are not only present in SLOs but are abundant in nonlymphoid organs during inflammation (29, 45). Additionally, gp38<sup>+</sup> cells display multiple functions besides providing the structural framework for immune cells (4, 23, 24, 44). Here we show that the number of gp38<sup>+</sup> cells expands during liver injury and decreases upon resolution, providing the first evidence for a close association of these cells with the status of liver inflammation. Importantly, these stromal cells were not components of classical TLSs in the three models of liver inflammation investigated. Thus the formation of TLS is associated with specific pathological processes in the liver as observed in human primary biliary cirrhosis (21) and murine granulomatous hepatitis (48). Additionally, multiple subsets of stromal cells could be identified within the healthy and injured liver: mesothelial

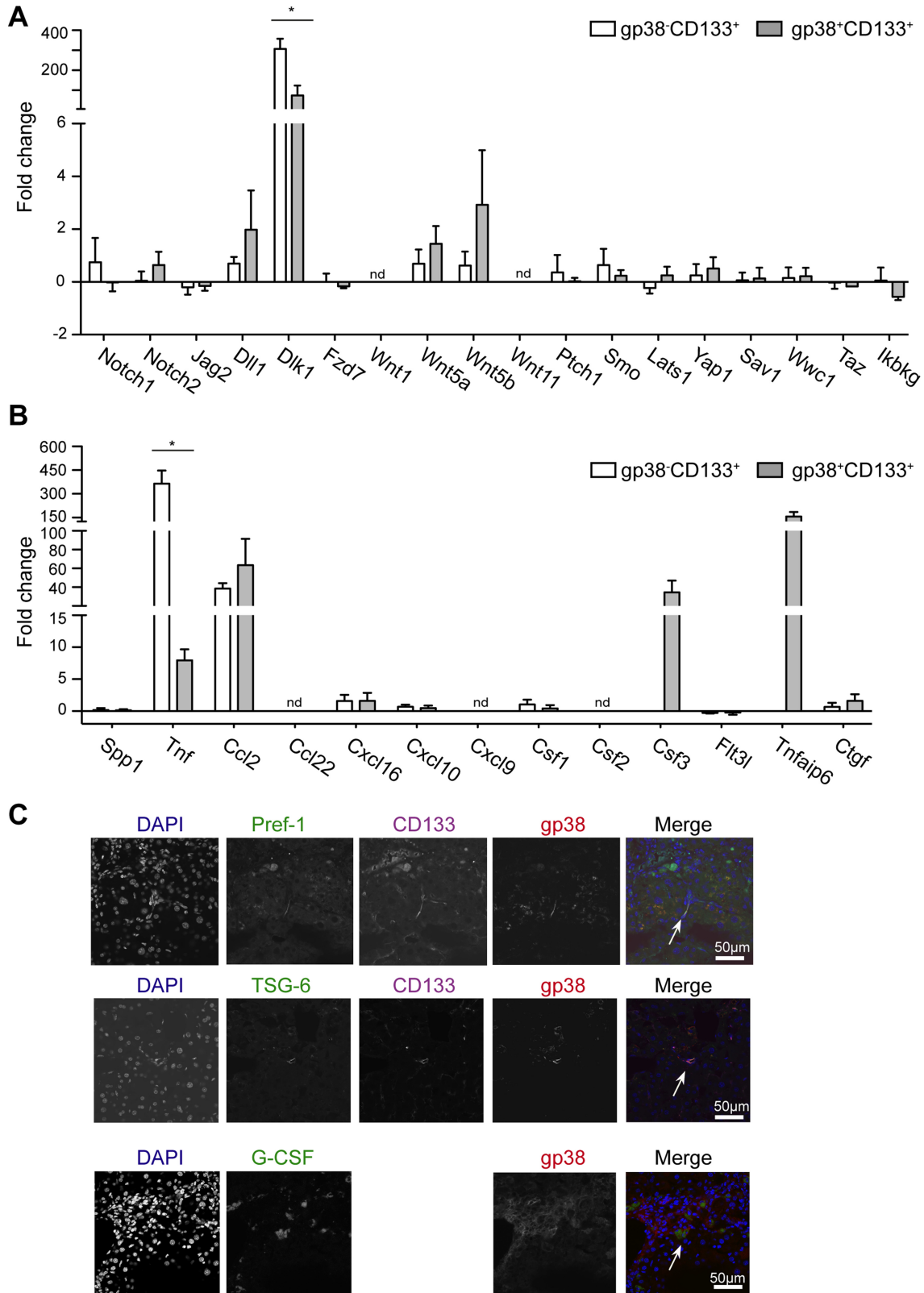


Fig. 6. gp38<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> and gp38<sup>-</sup>CD133<sup>+</sup> cells demonstrate differences in inflammatory genes. qPCR was performed from sorted cells. Graph depicts mean fold change ± SE compared with healthy animals. Three independent sorts/subset were performed. *A*: genes are related to Notch, Wnt, hedgehog, and Hippo pathway. *B*: genes are involved in inflammation and myeloid-lymphoid cell interaction. *C*: cryosections from CCl<sub>4</sub>-treated liver stained for gp38, (CD133), DAPI, and either Pref-1, TSG-6, or G-CSF (×40 objectives; scale bar = 50 μm). Data are representative of 2 independent experiments, *n* = 3 mice/group and 1 mold/organ/mouse. \**P* < 0.05.

cells ( $gp38^{hi}CD133^{-}$ ), cells associated with multiple mesenchymal/progenitor surface markers ( $gp38^{low}CD133^{-}$ ), and a novel subpopulation ( $gp38^{+}CD113^{+}$ ) within  $CD133^{+}$  progenitor compartment displaying oval cell characteristics. Except for DPPIV (CD26) the  $gp38^{-}CD113^{-}$  population did not express any of the additional surface markers used in this study requiring further characterization.

CD90 expression is associated with progenitor cells in multiple studies (16, 17, 43), most of which used in vitro expansion techniques to study oval cells. We identified CD90 as a selective marker associated with  $gp38^{hi}CD113^{-}$  mesothelial cells. Notably, in vitro expansion of the liver stromal fraction allows the proliferation of mesothelial cells (data not shown) possibly accounting for the presence of CD90 in prior studies. In the present study, mesothelial cells were also exclusively expressing CD157, also known as bone marrow stromal cell antigen-1. This molecule has been associated with immune regulation and inflammation (e.g., in rheumatoid arthritis) (5). This is especially intriguing as mesothelial cells express other immunoregulatory molecules such as CD200 and can transdifferentiate towards hepatic stellate cells and myofibroblasts (19, 22). Such a trans-differentiation process, however, only occurs within 150- $\mu$ m distance close to the liver surface (19, 22). Importantly,  $gp38^{hi}CD133^{-}$  cells exhibited slightly increased frequencies during inflammation that could indicate their contribution to mesothelial-mesenchymal transition close to the liver surface or might reflect surface changes accompanying liver diseases. How the identified immunomodulatory CD157 might modulate the function of these cells remains to be determined.

Two surface molecules, Sca-1 and CD34, could unequivocally identify the  $gp38^{low}CD133^{-}$  cells. CD34, a hematopoietic stem cell marker, has also been identified in bone marrow-mesenchymal stem cells and adipose tissue-derived stem cells (20). Importantly, the frequency of this progenitor population showed selective expansion in liver injury associated with *Mdr2* deficiency. The absence of the hepatobiliary transporter *Mdr2* biliary fibrosis resembles of primary sclerosing cholangitis in humans (13, 34). It remains to be elucidated whether the expanding population of  $gp38^{low}CD133^{-}$  cells contributes to the pathogenesis of this liver disease. Although these cells did not change in  $CCl_4$ -induced liver injury, their CD326 expression increased significantly. This may be due to the portal fibrotic component in both disease models (31). CD326 (EpCAM) has a dual role as cell adhesion molecule and receptor involved in the regulation of gene transcription and cell proliferation (26). Additionally, full-length EpCAM is a precursor for its signaling moiety that after cleavage translocates to the nucleus and promotes gene transcription (26). Thus the observed CD326 (EpCAM) upregulation could alter signaling events or adhesion properties in  $gp38^{low}CD133^{-}$  progenitor cells that needs further clarification.

The  $gp38^{-}CD133^{+}$  and the  $gp38^{+}CD133^{+}$  subsets showed alterations either in frequency or in CD326 expression in all three liver injury models. This is in accordance with the identification of the  $CD133^{+}$  cells (involving both subsets) as progenitor/oval cells in previous studies (7, 8, 38). Additionally, this is in line with evidence that certain amounts of oval cells are present in fibrosis and in steatohepatitis not only in mouse models but in humans as well (14). Additionally, the  $gp38^{+}CD133^{+}$  subset within the  $CD133^{+}$  compartment exhib-

ited great similarities to the  $gp38^{-}CD133^{+}$  cells in multiple progenitor-associated genes under steady state and in inflammation. Notably, the mRNA level did not differ in these populations between steady state and inflammation, despite the increase in CD326 expression on the protein level. The similarities in their gene expression profile may suggest two different developmental stages present of the same cell type that remain to be elucidated.

Upon  $CCl_4$  treatment, both cell subsets ( $gp38^{+}CD133^{+}$ ,  $gp38^{-}CD133^{+}$ ) showed similar changes in various pathway components related to hedgehog, Wnt, and Notch signaling. All of these pathways have been previously linked to oval cell function and liver regeneration (11). Specifically, the presence of *Dlk1/Pref-1* in both populations on the mRNA level could be confirmed in  $CCl_4$ -treated liver sections. *Pref-1* is a non-canonical Notch ligand that acts as an inhibitor of Notch signaling in vitro (12), but its in vivo role is less well understood. Nevertheless, *Pref-1* is strongly upregulated in regenerating liver and a neutralizing antibody decreased progenitor cell proliferation during regeneration (50). Moreover, *Pref-1* promotes liver fibrosis progression via activating hepatic stellate cells (28), suggesting a direct profibrotic activity. This is in line with emerging evidence that hepatic progenitor activation is linked to a fibrogenic response (18, 37). How the expression of *Pref-1* by the different progenitor subsets contributes to this process remains to be determined. During liver injury inflammatory mediators are released and various cellular interactions ensure progenitor cell activation and expansion (7, 11), a cellular process that is not completely understood in detail. Lymphocytes support progenitor cell activation (40) and macrophages influence the activation and the direction of the differentiation process (1, 10). According to this,  $gp38^{+}CD133^{+}$  and  $gp38^{-}CD133^{+}$  cells express multiple cytokines such as *CCL2*, *Flt3l*, and *CXCL10* that recruit and influence various immune cells. This indicates a strong interplay between immune and stromal cells during liver injury and stresses further the complex role of progenitor cells in liver inflammation.

*TSG-6*, an anti-inflammatory protein, promotes liver regeneration in acute liver injury (25, 46). Although the molecular mechanism is not completely understood, the selective expression of *TSG-6* in  $gp38^{+}CD133^{+}$  pinpoints a progenitor subset specific role in this process. Besides *TSG-6*, DPs were selectively enriched in G-CSF during liver inflammation. Based on genetic analyses, CSF signaling occurs together with liver regeneration and progenitor expansion (2, 33) and has been recently identified in human livers (32), stressing its relevance in this process. Notably, G-CSF expression was not exclusively restricted to  $gp38^{+}CD133^{+}$  cells but could be found in liver parenchymal cells (data not shown).

Taken together, we have delineated a close correlation between the abundance of  $gp38^{+}$  stromal cells and liver injury. With the use of various surface markers, multiple subsets of stromal cells were identified. Importantly, injury specific distribution of the identified subsets could be observed, outlining the complexity of inflammatory response and progenitor cell expansion accompanying liver diseases. This subset differences might reflect the phenotypic complexity and variance of ductular reaction observed in human liver diseases (14). In addition to this, the presented subset distribution is especially relevant, as previous studies mostly used a single surface

marker to identify progenitor cells (6, 8, 9, 16, 27, 38), barely reflective of the true composition or function of this cellular compartment. This is especially true for markers that are exclusively associated with one subset such as CD90, CD34, and Sca-1. In multiple studies A6 antibody targeting an unknown epitope has been used as a classical oval cell marker to identify these cells in mice (8, 9, 30). It remains to be determined how the novel CD133<sup>+</sup>gp38<sup>+</sup> subset relates to the distribution of this marker in situ. Additional studies are required delineating the plasticity and the cell specific contribution of the described subpopulations to liver inflammation, hepatocyte regeneration and fibrosis. Moreover, understanding the expanding stromal subpopulations and their interactions with immune cells could provide a better understanding of the pathomechanisms underlying these pathologies and yield novel therapeutic targets in chronic liver disease.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Marion Schwarz for excellent technical assistance with histology samples at the Institute of Anatomy and Cell Biology, University of Saarland.

GRANTS

This work was supported by Collaborative Research Center 894 Grant (to E. Krause), Deutsche Krebshilfe Grant 111184 (to M. Kornek), a European Research Council Advanced Grant (to D. Schuppan), and the Alexander von Humboldt Foundation, Sofja Kovalevskaja Award (to V. Lukacs-Kornek).

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: C.E., Y.O.K., H.J., E.-C.H., N.K., and V.L.-K. performed experiments; C.E., H.J., and V.L.-K. analyzed data; Y.O.K., M.K., D.S., and V.L.-K. interpreted results of experiments; E.K., T.T., M.K., F.L., D.S., and V.L.-K. approved final version of manuscript; F.L., D.S., and V.L.-K. edited and revised manuscript; V.L.-K. conception and design of research; V.L.-K. prepared figures; V.L.-K. drafted manuscript.

REFERENCES

1. Boulter L, Govaere O, Bird TG, Radulescu S, Ramachandran P, Pellicoro A, Ridgway RA, Seo SS, Spee B, Van Rooijen N, Sansom OJ, Iredale JP, Lowell S, Roskams T, Forbes SJ. Macrophage-derived Wnt opposes Notch signaling to specify hepatic progenitor cell fate in chronic liver disease. *Nat Med* 18: 572–579, 2012.
2. Chen XG, Xu CS. Expression profiles uncover the relevance between colony stimulating factor-mediated signaling pathways in liver cells and partial hepatectomy-induced hepatic regeneration. *Genet Mol Res* 13: 6356–6366, 2014.
3. Choi H, Lee RH, Bazhanov N, Oh JY, Prockop DJ. Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF-kappaB signaling in resident macrophages. *Blood* 118: 330–338, 2011.
4. Cremasco V, Woodruff MC, Onder L, Cupovic J, Nieves-Bonilla JM, Schildberg FA, Chang J, Cremasco F, Harvey CJ, Wucherpfennig K, Ludewig B, Carroll MC, Turley SJ. B cell homeostasis and follicle confines are governed by fibroblastic reticular cells. *Nat Immunol* 15: 973–981, 2014.
5. Deaglio S, Robson SC. Ectonucleotidases as regulators of purinergic signaling in thrombosis, inflammation, and immunity. *Adv Pharmacol* 61: 301–332, 2011.
6. Dolle L, Best J, Empsen C, Mei J, Van Rossen E, Roelandt P, Snykers S, Najimi M, Al Battah F, Theise ND, Streetz K, Sokal E, Leclercq IA, Verfaillie C, Rogiers V, Geerts A, van Grunsven LA. Successful isolation of liver progenitor cells by aldehyde dehydrogenase activity in naive mice. *Hepatology* 55: 540–552, 2012.

7. Dolle L, Best J, Mei J, Al Battah F, Reynaert H, van Grunsven LA, Geerts A. The quest for liver progenitor cells: a practical point of view. *J Hepatol* 52: 117–129, 2010.
8. Dorrell C, Erker L, Lanxon-Cookson KM, Abraham SL, Victoroff T, Ro S, Canaday PS, Streeter PR, Grompe M. Surface markers for the murine oval cell response. *Hepatology* 48: 1282–1291, 2008.
9. Dorrell C, Erker L, Schug J, Kopp JL, Canaday PS, Fox AJ, Smirnova O, Duncan AW, Finegold MJ, Sander M, Kaestner KH, Grompe M. Prospective isolation of a bipotential clonogenic liver progenitor cell in adult mice. *Genes Dev* 25: 1193–1203, 2011.
10. Elsegood CL, Chan CW, Degli-Esposti MA, Wikstrom ME, Domenichini A, Lazarus K, van Rooijen N, Ganss R, Olynyk JK, Yeoh GC. Kupffer cell-monocyte communication is essential for initiating murine liver progenitor cell-mediated liver regeneration. *Hepatology* 62: 1272–1284, 2015.
11. Erker L, Grompe M. Signaling networks in hepatic oval cell activation. *Stem Cell Res* 1: 90–102, 2007.
12. Falix FA, Aronson DC, Lamers WH, Gaemers IC. Possible roles of DLK1 in the Notch pathway during development and disease. *Biochim Biophys Acta* 1822: 988–995, 2012.
13. Fickert P, Fuchsichler A, Wagner M, Zollner G, Kaser A, Tilg H, Krause R, Lammer F, Langner C, Zatloukal K, Marschall HU, Denk H, Trauner M. Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. *Gastroenterology* 127: 261–274, 2004.
14. Gouw AS, Clouston AD, Theise ND. Ductular reactions in human liver: diversity at the interface. *Hepatology* 54: 1853–1863, 2011.
15. Jiao J, Sastre D, Fiel MI, Lee UE, Ghiassi-Nejad Z, Ginhoux F, Vivier E, Friedman SL, Merad M, Aloman C. Dendritic cell regulation of carbon tetrachloride-induced murine liver fibrosis regression. *Hepatology* 55: 244–255, 2012.
16. Kamo N, Yasuchika K, Fujii H, Hoppo T, Machimoto T, Ishii T, Fujita N, Tsuruo T, Yamashita JK, Kubo H, Ikai I. Two populations of Thy1-positive mesenchymal cells regulate in vitro maturation of hepatic progenitor cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292: G526–G534, 2007.
17. Konishi S, Yasuchika K, Ishii T, Fukumitsu K, Kamo N, Fujita N, Ikai I, Uemoto S. A transmembrane glycoprotein, gp38, is a novel marker for immature hepatic progenitor cells in fetal mouse livers. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 47: 45–53, 2011.
18. Kuramitsu K, Sverdlow DY, Liu SB, Csizmadia E, Burkly L, Schuppan D, Hanto DW, Otterbein LE, Popov Y. Failure of fibrotic liver regeneration in mice is linked to a severe fibrogenic response driven by hepatic progenitor cell activation. *Am J Pathol* 183: 182–194, 2013.
19. Li Y, Wang J, Asahina K. Mesothelial cells give rise to hepatic stellate cells and myofibroblasts via mesothelial-mesenchymal transition in liver injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 2324–2329, 2013.
20. Lin CS, Ning H, Lin G, Lue TF. Is CD34 truly a negative marker for mesenchymal stromal cells? *Cytotherapy* 14: 1159–1163, 2012.
21. Link A, Hardie DL, Favre S, Britschgi MR, Adams DH, Sixt M, Cyster JG, Buckley CD, Luther SA. Association of T-zone reticular networks and conduits with ectopic lymphoid tissues in mice and humans. *Am J Pathol* 178: 1662–1675, 2011.
22. Lua I, James D, Wang J, Wang KS, Asahina K. Mesodermal mesenchymal cells give rise to myofibroblasts, but not epithelial cells, in mouse liver injury. *Hepatology* 60: 311–322, 2014.
23. Lukacs-Kornek V, Malhotra D, Fletcher AL, Acton SE, Elpek KG, Tayalia P, Collier A, Turley SJ. Regulated nitric oxide release by fibroblastic reticular cells and lymphatic endothelial cells controls the expansion of activated T cells within lymph nodes. *Nat Immunol* 12: 1096–1104, 2011.
24. Malhotra D, Fletcher AL, Turley SJ. Stromal and hematopoietic cells in secondary lymphoid organs: partners in immunity. *Immunol Rev* 251: 160–176, 2013.
25. Milner CM, Day AJ. TSG-6: a multifunctional protein associated with inflammation. *J Cell Sci* 116: 1863–1873, 2003.
26. Munz M, Baeuerle PA, Gires O. The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. *Cancer Res* 69: 5627–5629, 2009.
27. Okabe M, Tsukahara Y, Tanaka M, Suzuki K, Saito S, Kamiya Y, Tsujimura T, Nakamura K, Miyajima A. Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse liver. *Development* 136: 1951–1960, 2009.

28. **Pan RL, Wang P, Xiang LX, Shao JZ.** Delta-like 1 serves as a new target and contributor to liver fibrosis down-regulated by mesenchymal stem cell transplantation. *J Biol Chem* 286: 12340–12348, 2011.
29. **Peduto L, Dulauroy S, Lochner M, Spath GF, Morales MA, Cumano A, Eberl G.** Inflammation recapitulates the ontogeny of lymphoid stromal cells. *J Immunol* 182: 5789–5799, 2009.
30. **Petersen BE, Grossbard B, Hatch H, Pi L, Deng J, Scott EW.** Mouse A6-positive hepatic oval cells also express several hematopoietic stem cell markers. *Hepatology* 37: 632–640, 2003.
31. **Pinzani M, Macias-Barragan J.** Update on the pathophysiology of liver fibrosis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 4: 459–472, 2010.
32. **Piscaglia AC, Arena V, Passalacqua S, Gasbarrini A.** A case of granulocyte-colony stimulating factor/plasmapheresis-induced activation of granulocyte-colony stimulating factor-positive hepatic progenitors in acute-on-chronic liver failure. *Hepatology* 62: 649–652, 2015.
33. **Piscaglia AC, Shupe TD, Oh SH, Gasbarrini A, Petersen BE.** Granulocyte-colony stimulating factor promotes liver repair and induces oval cell migration and proliferation in rats. *Gastroenterology* 133: 619–631, 2007.
34. **Popov Y, Patsenker E, Fickert P, Trauner M, Schuppan D.** Mdr2 (Abcb4)<sup>-/-</sup> mice spontaneously develop severe biliary fibrosis via massive dysregulation of pro- and antifibrogenic genes. *J Hepatol* 43: 1045–1054, 2005.
35. **Popov Y, Sverdlov DY, Sharma AK, Bhaskar KR, Li S, Freitag TL, Lee J, Dieterich W, Melino G, Schuppan D.** Tissue transglutaminase does not affect fibrotic matrix stability or regression of liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* 140: 1642–1652, 2011.
36. **Pritchard MT, Nagy LE.** Hepatic fibrosis is enhanced and accompanied by robust oval cell activation after chronic carbon tetrachloride administration to Egr-1-deficient mice. *Am J Pathol* 176: 2743–2752, 2010.
37. **Richardson MM, Jonsson JR, Powell EE, Brunt EM, Neuschwander-Tetri BA, Bhathal PS, Dixon JB, Weltman MD, Tilg H, Moschen AR, Purdie DM, Demetris AJ, Clouston AD.** Progressive fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis: association with altered regeneration and a ductular reaction. *Gastroenterology* 133: 80–90, 2007.
38. **Rountree CB, Barsky L, Ge S, Zhu J, Senadheera S, Crooks GM.** A CD133-expressing murine liver oval cell population with bilineage potential. *Stem cells* 25: 2419–2429, 2007.
39. **Shin S, Walton G, Aoki R, Brondell K, Schug J, Fox A, Smirnova O, Dorrell C, Erker L, Chu AS, Wells RG, Grompe M, Greenbaum LE, Kaestner KH.** Foxl1-Cre-marked adult hepatic progenitors have clonogenic and bilineage differentiation potential. *Genes Dev* 25: 1185–1192, 2011.
40. **Strick-Marchand H, Masse GX, Weiss MC, Di Santo JP.** Lymphocytes support oval cell-dependent liver regeneration. *J Immunol* 181: 2764–2771, 2008.
41. **Tanimizu N, Nishikawa M, Saito H, Tsujimura T, Miyajima A.** Isolation of hepatoblasts based on the expression of Dlk/Pref-1. *J Cell Sci* 116: 1775–1786, 2003.
42. **Tarlow BD, Finegold MJ, Grompe M.** Clonal tracing of Sox9+ liver progenitors in mouse oval cell injury. *Hepatology* 60: 278–289, 2014.
43. **Tirnitz-Parker JE, Tonkin JN, Knight B, Olynyk JK, Yeoh GC.** Isolation, culture and immortalisation of hepatic oval cells from adult mice fed a choline-deficient, ethionine-supplemented diet. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 2226–2239, 2007.
44. **Turley SJ, Fletcher AL, Elpek KG.** The stromal and haematopoietic antigen-presenting cells that reside in secondary lymphoid organs. *Nat Rev Immunol* 10: 813–825, 2010.
45. **van de Pavert SA, Mebius RE.** New insights into the development of lymphoid tissues. *Nat Rev Immunol* 10: 664–674, 2010.
46. **Wang S, Lee JS, Hyun J, Kim J, Kim SU, Cha HJ, Jung Y.** Tumor necrosis factor-inducible gene 6 promotes liver regeneration in mice with acute liver injury. *Stem Cell Res Ther* 6: 20, 2015.
47. **Yimlamai D, Christodoulou C, Galli GG, Yanger K, Pepe-Mooney B, Gurung B, Shrestha K, Cahan P, Stanger BZ, Camargo FD.** Hippo pathway activity influences liver cell fate. *Cell* 157: 1324–1338, 2014.
48. **Yoneyama H, Matsuno K, Zhang Y, Murai M, Itakura M, Ishikawa S, Hasegawa G, Naito M, Asakura H, Matsushima K.** Regulation by chemokines of circulating dendritic cell precursors, and the formation of portal tract-associated lymphoid tissue, in a granulomatous liver disease. *J Exp Med* 193: 35–49, 2001.
49. **Yovchev MI, Zhang J, Neufeld DS, Grozdanov PN, Dabeva MD.** Thymus cell antigen-1-expressing cells in the oval cell compartment. *Hepatology* 50: 601–611, 2009.
50. **Zhu NL, Asahina K, Wang J, Ueno A, Lazaro R, Miyaoka Y, Miyajima A, Tsukamoto H.** Hepatic stellate cell-derived delta-like homolog 1 (DLK1) protein in liver regeneration. *J Biol Chem* 287: 10355–10367, 2012.



# The complex myeloid network of the liver with diverse functional capacity at steady state and in inflammation

Christoph Eckert, Niklas Klein, Miroslaw Kornek and Veronika Lukacs-Kornek\*

Department of Medicine II, Saarland University Medical Center, Homburg, Germany

## Edited by:

Florent Ginhoux, Singapore  
Immunology Network, Singapore

## Reviewed by:

Frank Tacke, University Hospital  
Aachen, Germany  
Charles-Antoine Dutertre, Duke-NUS  
Graduate Medical School, Singapore

## \*Correspondence:

Veronika Lukacs-Kornek, Department  
of Medicine II, Saarland University  
Medical Center, Kirrbergerstr. 100,  
Homburg 66424, Germany  
e-mail: veronika.lukacs-kornek@  
uniklinikum-saarland.de

In recent years, it has been an explosion of information regarding the role of various myeloid cells in liver pathology. Macrophages and dendritic cell (DC) play crucial roles in multiple chronic liver diseases such as fibrosis and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). The complexity of myeloid cell populations and the missing exclusive marker combination make the interpretation of the data often extremely difficult. The current review aims to summarize the multiple roles of macrophages and DCs in chronic liver diseases, especially pointing out how these cells influence liver immune and parenchymal cells thereby altering liver function and pathology. Moreover, the review outlines the currently known marker combinations for the identification of these cell populations for the study of their role in liver immunology.

**Keywords:** dendritic cells, Kupffer cells, liver fibrosis, NASH, inflammatory monocytes

## LIVER AS AN IMMUNE MILIEU

The liver functions as a metabolic center to ensure the proper processing of nutrients and the clearance of toxins; yet, plays multiple roles in systemic immune responses and in immune surveillance. The liver receives blood from both the systemic circulation and the intestine that mixes within the liver sinusoids (1). Approximately, two-third of the hepatic blood flow procures from the oxygen rich arteria hepatica and one-third is from the vena porta carrying microbial and food-derived antigens and molecules (1, 2). The mixed blood travels through the sinusoids that are specialized blood vessels lined by the liver sinusoidal endothelial cells (LSECs). LSECs assemble a discontinuous endothelium that is in contact with various passenger and organ-resident immune cells (3). Besides LSECs, the liver contains other parenchymal cells such as hepatocytes and hepatic stellate cells (HSCs). The activation status and extracellular matrix production of HSCs are critical for the progression of multiple liver diseases (4, 5). Importantly, these liver parenchymal cells interact with the variety of immune cells, influence memory T cells, respond to danger signals, and additionally take on the role of antigen presenting cells (APCs) within the liver (6, 7). As APCs, they present antigens

in the context of immunosuppressive cytokines and inhibitory surface molecules resulting largely in tolerance (6, 7). The liver also encompasses large populations of hematopoietic cells such as innate lymphocytes (NK, NKT cells, and  $\gamma\delta$ T cells) and myeloid cells [dendritic cells (DCs) and macrophages] (6). Multiple cross-talks exist between hematopoietic cells and liver parenchymal cells at steady state and during injury. This review focuses on the physiological and pathological roles of liver DCs and macrophages paying special attention to chronic liver diseases such as fibrosis and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD).

## LIVER DENDRITIC CELLS

Dendritic cells are present in all tissues and represent the major APCs within the body (8). They constantly sense their environment and capable of recognizing pathogens and various danger signals. Activation of DCs results in their maturation toward several functionally distinct “effector DCs” (9) that drive T cell responses, such as T helper cell differentiation, induction of CTL, and T cell tolerance (9). Additionally, DCs communicate with innate lymphocytes (e.g., NK, NKT cells), therefore, can influence both innate and adaptive immune responses (8).

Murine liver DC population, similarly as in most non-lymphoid organs (except the lamina propria and dermis), consists of three types of DCs (Table 1): the cDC1s (classical type 1 DCs), the cDC2s (classical type 2 DCs), and pDCs (10, 11). Despite of this categorization, in most liver studies, DCs are evaluated as either CD11c<sup>+</sup> or MHCII<sup>+</sup> cells. Although neither of the molecules pinpoint exclusively DCs, using these markers liver DCs are primarily located within the portal area and rarely scattered within the parenchyma (6). The cDC1 cells resemble lymphoid tissue CD8<sup>+</sup> DCs, show migratory capacity in various non-lymphoid organs, and can efficiently cross-present cell-associated antigens (10, 11). Although the role of DC migration in liver pathology has not been explored in details, antigen injected or targeted to the

**Abbreviations:** APC, antigen presenting cell; BDL, bile duct ligation; BM, bone marrow; DCs, dendritic cells; Batf3, basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3; CCL4, carbon tetrachloride; CCR9, chemokine (C-C motif) receptor 9; CTL, cytotoxic T lymphocyte; DNGR-1, DC NK lectin group receptor-1; DT, diphtheria toxin; DTR, diphtheria toxin receptor; ECM, extracellular matrix; FA, fatty acid; Flt3L, FMS-like tyrosine kinase 3 ligand; GM-CSF, granulocyte macrophage colony-stimulating factor; HSC, hepatic stellate cells; HL-DC, high-lipid liver dendritic cell; Id2, inhibitor of DNA binding 2; IL, interleukin; KC, Kupffer cells; LL-DC, low-lipid liver dendritic cell; LSEC, liver sinusoidal endothelial cells; LPS, lipopolysaccharide; MCD, methionine choline deficient; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; MMP-9, matrix metalloproteinase-9; MMP13, matrix metalloproteinase-13; NASH, non-alcoholic steatohepatitis; pDC, plasmacytoid dendritic cell; PDL-1, programmed cell death 1 ligand; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor-alpha; TAA, thioacetamide; TLR, toll like receptor; zbtb46, zinc finger and BTB domain containing.

**Table 1 | Summary of DC and macrophage population in healthy and injured liver.**

Cell types	Murine	Human	Reference
<b>Dendritic cells</b>			
Classical Type 1 DCs (cDC1)	CD45 <sup>+</sup> PDCA1 <sup>-</sup> CD11c <sup>+</sup> CD11b <sup>-</sup> CD103 <sup>+</sup> MHCII <sup>+</sup> Langerin <sup>+/-</sup> F4/80 <sup>-</sup> CX3CR1 <sup>-</sup>	CD45 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> CD141 <sup>+</sup> CD123 <sup>-</sup> CD11c <sup>+</sup> CD14 <sup>-</sup>	(8, 15)
Classical Type 2 DCs (cDC2)	CD45 <sup>+</sup> PDCA1 <sup>-</sup> CD11c <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD103 <sup>-</sup> MHCII <sup>+</sup> F4/80 <sup>+/-</sup> Langerin <sup>-</sup> CX3CR1 <sup>+</sup>	CD45 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> CD1c <sup>+</sup> CD123 <sup>-</sup> CD11c <sup>+</sup> CD141 <sup>-</sup> CD14 <sup>+</sup>	(10, 15–17)
pDCs	CD45 <sup>+</sup> PDCA1 <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup>	HLA-DR <sup>+</sup> CD123 <sup>+</sup> CD11c <sup>-</sup> CD303 <sup>+</sup> CD304 <sup>+</sup>	(17)
pre-DCs	CD45 <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> MHCII <sup>-</sup> Flt3 <sup>+/-</sup>	ND	(18)
<b>Macrophages</b>			
KCs	CD68 <sup>+</sup> F4/80 <sup>+</sup> CD11b <sup>low</sup> Ly6C <sup>low</sup> Ly6G <sup>-</sup> TLR4 <sup>+</sup> TLR9 <sup>+</sup>	CD68 <sup>+</sup>	(19–22)
Ly6C <sup>hi</sup> classical monocytes	F4/80 <sup>+</sup> CD11b <sup>hi</sup> Ly6C <sup>hi</sup> Gr1 <sup>+</sup> CX3CR1 <sup>+</sup> CCR2 <sup>+</sup>	CD14 <sup>hi</sup> CD16 <sup>-</sup>	(23, 24)
M1 inflammatory macrophages/monocytes	F4/80 <sup>+</sup> CCR9 <sup>+</sup> iNOS <sup>+</sup> galectin-3 <sup>+</sup>	CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> (it is not yet clarified how they differ from non-classical monocytes)	(25–27)
Restorative macrophages	F4/80 <sup>+</sup> CD11b <sup>low</sup> Ly6C <sup>low</sup>	CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	(24, 26, 28)

DCs and macrophages are classified according to the recently suggested nomenclature based on the ontogeny of these cells (15). The M1 type monocyte/macrophage population present in liver injury and the restorative macrophages during resolution could not be incorporated in this nomenclature as their origin and relation to monocytes and resident liver macrophages (KCs) need further clarification in the future. DCs, dendritic cells; KCs, Kupffer cells; pDCs, plasmacytoid DCs; pre-DCs, precursor DCs.

liver reaches the draining LN and induces T cell activation (12, 13). Additionally, migratory DCs could be identified within the portal lymphatic vessels in electronmicroscopy analyses (1, 14).

The cDC2s within non-lymphoid organs are heterogeneous and partially monocyte lineage derived (10, 11). Their specific role is less understood in non-lymphoid organs, involving the liver as well. While the development of this subset depends in most non-lymphoid organs on the presence of FLT3L and M-CSF, in the liver, these cells are not exclusively dependent on these growth factors but yet on an unidentified molecule (10). The liver, similarly to other non-lymphoid tissues, contains not only fully differentiated DCs but precursor DC population as well. From these pre-DCs, either FLT3L or GM-CSF can induce liver DC development bestowing DC homeostasis *in situ* (29, 30).

Functionally, CD11c<sup>+</sup> cells isolated from healthy mouse liver are less mature, have lower capacity to endocytose antigen, and induce less efficient allogenic T cell activation as secondary lymphoid organ (SLO)-derived DCs (31, 32). The inhibitory/tolerogenic capacity of liver DCs could be attributed to the specific microenvironment provided by parenchymal cells of the liver. Fibroblastic and VCAM<sup>+</sup> cells derived from the liver could induce hematopoietic progenitor cells to differentiate toward tolerogenic DCs *in vitro* that can inhibit experimental autoimmune hepatitis (33). It is assumed that circulatory DCs during their translocation within the liver sinusoids toward the lymphatics receive such tolerogenic education from liver parenchymal cells (14, 34). Yet, its *in vivo* relevance needs to be elucidated.

Freshly isolated murine liver CD11c<sup>+</sup> cells promote Th2 rather than Th1 T cell differentiation and via interacting with NK cells induce regulatory T cell (Treg) development (35, 36). Moreover, liver DCs produce increased amount of IL-10, IL-27 but less IL-12 upon LPS stimuli (37, 38). This hyporesponsive behavior toward TLR stimuli, known as endotoxin tolerance, involves LPS/TLR4

but also extends toward other TLRs (6). This is especially important, as the liver is constantly exposed to gut derived microbial products. The breakdown in this tolerance could be observed in colitis where pro-inflammatory DC/macrophage population expands within the liver due to the increased amount of bacterial products present in the portal blood. This creates an inflammatory environment in the liver despite the absence of direct liver damage (39). The tolerant state toward TLRs is an active process and involves the action of various negative regulators of the TLR signaling pathway (6). Interestingly, under steady state, liver DCs rather respond to ECM stimuli (collagen-type I, laminin, fibronectin) that induces MHC-II upregulation and maturation of GM-CSF expanded liver DCs *in vitro* (40).

In humans, the cDC2 cells (CD11c<sup>+</sup> BDCA1<sup>+</sup>) are the most abundant in the liver and they exhibit similar immature, tolerogenic capacity as their murine counterpart (16, 41) (Table 1). The cDC1 cell population that expresses CD141<sup>+</sup> has been recently identified as a counterpart of murine CD8α<sup>+</sup> cells (42). These cells induce pro-inflammatory allogeneic MLRs, resulting in IFN-γ and IL-17 production by activated T cells (17). Importantly, as opposite to cDC2s and pDCs, cDC1s (identified in the study as CD141<sup>+</sup> cells) were markedly decreased during liver diseases but among the DC-subsets produced the highest level of IFN-λ (17). It is possible that functional differences are reflected among the DC subsets and each subset represents different aspects of liver immunity and tolerance. In line with this, a classification of murine liver DCs according to their lipid content distinguishes between immunogenic and tolerogenic liver DCs. Due to their acetyl-CoA carboxylase activity, HL-DCs (high lipid DCs) mount strong immunogenic CTLs while the LL-DCs (low lipid DCs) with low lipid content are tolerogenic (43). Notably, the marker combinations used for this study showed that both HL-DCs and LL-DCs include multiple DC-subsets distinguished by currently known



surface markers and were not restricted to one specific subset. Novel surface molecules are needed to specifically explore their functional diversity.

pDCs are the major source of type-I IFN, regulate NK cell activity, and play important role in the induction of antiviral immunity (44, 45). The murine liver is especially rich in pDCs; yet, the human counterpart contains a smaller proportion of this population among all DCs (17) (**Table 1**). Under steady state condition, pDCs express low level of costimulatory molecules, are weak T cell stimulators, and induce apoptosis in activated T cells in a Treg dependent manner (46). Later could indicate a cellular interplay between pDCs and Tregs in the liver microenvironment in order to maintain the tolerogenic milieu. Accordingly, pDCs can induce efficient CD4 and CD8 T cell tolerance to orally administered antigens (47).

Microbial products, such as muramyl dipeptide present in the portal blood, upregulate PDL-1 in pDCs and reduce their response to TLR9 stimuli (48). This is another example for the TLR-mediated hyporesponsiveness (“endotoxin tolerance”) in the liver. Strikingly, upon FLT3L treatment, the expanded liver pDCs display strong immunostimulatory properties (49). It is unclear whether this could be due to the expansion of a specific subpopulation of pDCs, or their modified interaction with Tregs, or the result of the complete rearrangement in the myeloid cell compartment, and the consequent imbalance in the tolerogenic milieu.

Taken together, the multiple DC subsets within the liver participate in guarding the tolerogenic environment and primarily skewed toward suppressing T cell responses and toward induction of Tregs. While DCs are the main APCs and inducers of T cell immunity in SLOs, within the liver environment the question still remains: how immunity can be induced by DCs in such suppressive microenvironment? Induction of immunity might be attributed to special DC subpopulations such as the CD141<sup>+</sup> cDC1s in humans (17) and the CD103<sup>+</sup> cDC1s in mice (50). Moreover, the appearance of novel DC population, such as monocyte-derived DCs present in iMATEs (intrahepatic myeloid-cell aggregates for T cell population expansion), participates in efficient CLT expansion within the liver (51). Alternatively, immunity is induced by migratory DCs reaching the draining LN, thus, outside of the liver suppressive environment. In line with this, antigen specifically expressed in draining LN results in hepatitis inducing CD8 T cell activation, while the same antigen within the liver induces tolerance (52). Additionally, the liver can provide newly formed structures for T cell activation resulting in immunity. Portal tract associated lymphatic structures (PALPs) during *Propionibacterium acnes* granuloma formation and tertiary lymphoid structures in biliary cirrhosis represent locations where possible T and B cell activation takes place, respectively (53, 54).

## KUPFFER CELLS – RESIDENT MACROPHAGE POPULATION OF THE LIVER

Kupffer cells (KCs) are tissue resident macrophages and they represent the largest hematopoietic cell population within the liver. They arise from yolk sac during fetal development (55), adjust themselves to the local microenvironment (56, 57), and renew their population at steady state locally throughout adult life with no or minimal contribution of hematopoietic progenitors or blood

monocytes (58–60). In mice, KCs can be distinguished from monocytes among the F4/80<sup>+</sup> cells as Ly6C<sup>low</sup> CD11b<sup>low</sup> cell population (20, 21) (**Table 1**) and possess functional specifications according to their positioning within the sinusoid (61). Recent study could distinguish two KC functional groups: the one with higher phagocytosis capacity and the one with preference toward cytokine production (61, 62). Additionally, macrophages are functionally grouped into two classes M1 and M2. While such plain classification is questionable and often overstated, still provide a simple but distinguishable concept for functional categorization of these cells. M1 (termed classically activated) macrophages are pro-inflammatory, while the M2 (termed alternatively activated) macrophages are suppressive and involved in cellular repair (63). According to this, KCs belong to the M2 type of cells and play fundamental role in homeostasis, immune surveillance, and tissue repair (63).

Their importance as tolerogenic APCs in the liver microenvironment is demonstrated in liver transplantation where they prolong allograft survival (31). At steady state, they inhibit DC mediated T cell activation within the sinusoids and presentation of high affinity peptide by KCs results in deletional CD8 T cell tolerance (6, 64). Furthermore, they promote the suppressive capacity of Tregs toward hepatic antigens (65, 66).

As all tissue resident macrophages, KCs express a wide repertoire of receptors for the recognition of pathogens and danger signals such as Toll-like receptors, members of the inflammasome, and scavenger receptors (31). In the presence of TLR ligands such as LPS and CpG, KCs become immunogenic, and can induce CD8 T cell activation, and the generation of efficient CTL response (67, 68). Thus, during liver infection, they support the development of antimicrobial T cell responses. Unfortunately, KCs induce efficient CTL against antigens from the systemic circulation such as the case in influenza infection (69). This CTL response results in bystander hepatitis, often accompanying systemic viral infections. Besides CD8 T cell responses, recent study describes naive CD4 T cell activation in the murine liver by antigens expressed in hepatocytes. This process is independent from lymphoid tissue but dependent on clodronate-sensitive liver APC population possibly involving KCs as well (70). Thus, KCs participate in the generation of both CD4 and CD8 T cell responses.

Using their scavenger receptor repertoire, KCs are involved in the clearance of apoptotic cell debris and central to iron homeostasis (71). KCs interact with multiple immune cells within the sinusoids, such as Tregs, DCs, DC precursors, and innate lymphocytes (7, 53, 72, 73). After recognizing any danger signals, KCs primarily drive the influx of inflammatory leukocytes such as neutrophils and monocytes (63). Thus, KCs function as sentinels and central orchestrators of cellular processes in healthy and injured liver. Additionally, while they support the tolerogenic milieu within the liver, their presence also ensures the protection of the liver during pathogen invasion.

## TOOLS TO STUDY LIVER DCs AND MACROPHAGES

In order to characterize the specific physiological and pathological roles of DCs and macrophages, various animal models, tools have been developed (**Table 2**) Among these models, there are mouse lines deficient in transcription factors that are responsible

**Table 2 | Summary of the available models to study liver macrophages and DCs.**

Animal model	Cell types affected	Liver fibrosis/NASH studies
<b>Transcription factors</b>		
Cfsr1 <sup>op/op</sup> , Cfsr1 <sup>-/-</sup> , Csf2 <sup>-/-</sup>	Macrophages, monocytes, some DCs, granulocytes	ND
Batf3 <sup>-/-</sup> , ID2 <sup>-/-</sup> , IRF8 <sup>-/-</sup>	CD8 <sup>+</sup> DCs, CD103 <sup>+</sup> DC	ND
Flt3L <sup>-/-</sup> , injection of FLT3L	CD8 <sup>+</sup> CD11b <sup>-</sup> , CD11b <sup>+</sup> DCs, pDCs	(75)
IRF2 <sup>-/-</sup> , IRF4 <sup>-/-</sup>	CD8 <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup> DCs	ND
<b>DTR system</b>		
CD11c-DTR-short promoter-long promoter	DCs, plasmablast, some activate CD8 T cells, marginal zone macrophages, alveolar macrophages, some B cells	(75–78)
CD11b-DTR	All above + some NK and NKT, pDCs, monocyte-derived DCs	(28, 79, 80)
CD169-DTR	Splenic MM macrophages, LN macrophages, BM macrophages, KC	ND
Langerin-DTR	Langerin <sup>+</sup> dermal DCs, langerhans cells, some CD8 <sup>+</sup> DCs, and some CD103 <sup>+</sup> DCs	ND
Zbtb46-DTR	DCs and DC committed progenitors, monocytes (IL-4 and GM-CSF)	ND
<b>Clodronate liposome mediated cell depletion</b>	Macrophages, some DCs, monocytes	(81–86)
<b>Reporter/Cre mouse lines</b>		
CX3CR1-GFP	Macrophages, monocytes, some DCs	(87, 88)
Cfsr1-GFP (MacGreen)	Macrophages, monocytes, some DCs	
Lyz2-GFP/Lyz2-Cre	Macrophages, granulocytes	
Cfsr1-GFP	Macrophages, monocytes, some DCs	
CCR2-RFP	Monocytes, macrophages, memory T cells	
MHCII-EGFP	Macrophages, DC, B cells	
CD11c-YFP/CD11c Cre	See above	
Langerin-GFP	See above	
DNGR-1-GFP	DCs, pre-DCs	

ND, non-determined; DCs, dendritic cells; MM, marginal zone.

for the development of one or multiple subsets of myeloid cells. Due to the multiple cell types affected in these models, the broader impact of each of these genes makes it difficult to unequivocally pinpoint subset specific functions. Nevertheless, these transgenic animals helped significantly to establish broader understanding of macrophage and DC development and their role under steady state and inflammation (63, 74). However, just few of these models have been evaluated so far in fibrosis and non-alcoholic steatohepatitis (NASH) models (Table 2) but also in liver immunology. This might extend in the future as genetic model lacking cDC1s have just recently demonstrated that cDC1s respond to hepatotropic viral infection and are keys in the induction of anti-viral CD8 T cell response *in situ* (50).

The most frequently used cell-depleting tools in liver immunology are the clodronate liposome mediated depletion of mononuclear cells and the CD11c-/CD11b-DTR (diphtheria toxin receptor) transgenic system (87, 89). Clodronate-encapsulated liposomes are taken up by mononuclear cells and the clodronate bisphosphonate within the cell induces apoptosis that results in depletion of the phagocytic cell population. Multiple phagocytic cell types are affected using this depletion method such as KCs, macrophages, and some members of the DC population as well. Since more than one cell types are affected, the effects can be

extrapolated to a group of cells and not to individual subtypes (89). Additionally, the release of inflammatory mediators (such as TNF) has been associated with this type of cell depletion further complicating the interpretation of experimental results (90).

The other widely used tool for liver biology is the CD11c-DTR-based depletion system. Here, the human diphtheria toxin receptor is expressed under the CD11c promoter and administration of diphtheria toxin results in the depletion of CD11c<sup>+</sup> cells. This model is used to dissect the role of conventional DCs. The major disadvantage in this system is that multiple cell types are affected such as marginal zone macrophages, monocytes, activated CD8 T cells, NK cells, and plasmacytoid DCs (89). Two different CD11c-DTR mouse lines have been generated: the one encompassing only a short piece of the CD11c promoter (3) and the one with the full-length promoter (91). Although, they differ in the list of affected cell types, they gave important insights in the role of CD11c<sup>+</sup> cells in liver immunology (Table 2). Novel DTR tools have been developed in recent years that aim to restrict the expression of DTR more specifically to DCs. The zbtb-46-DTR model uses the transcription factor zbtb46 that is exclusively expressed by DCs and DC-committed precursors (92). Unfortunately, zbtb46 is upregulated in monocytes stimulated with GM-CSF and IL-4, suggesting some limitations to

this promoter (93, 94). Another promising promoter is the DC NK lectin group receptor-1 (DNNGR-1) that seems to be highly restricted to the DC lineage (95). Not only for DCs but also for the study of macrophages, the perfect targeting tool still needs to be developed. The primary tool for analyzing macrophages is the CD11b-DTR system. However, CD11b is a widely expressed marker among multiple immune cell types causing caveat for the interpretation of cell types using this model for understanding liver diseases (Table 2) (87).

To follow myeloid cells *in situ* using *in vivo* imaging, flow cytometry or microscopy multiple reporter mouse models have been developed. The promoters from different molecules such as e.g., CD11c, Csf1, CCR2, MHC-II, or CX3CR1 were used to generate these animal models (88) (Table 2). These models have their own limitations according to their expression profile that have been reviewed elsewhere (88) (Table 2). Some of the promoters are also utilized to express Cre recombinase (Table 2). Crossing these Cre expressing lines with animals carrying a floxed gene allows the analyses of the cell specific depletion of the gene of interest. Certainly, the specificity and limitation of the models are determined by the expression pattern of the promoter used for Cre expression (87). Despite the availability of these models, only limited have been exploited for understanding specifically liver fibrosis and NASH (Table 2).

Taken together, multiple models are available to answer liver immunological questions. While each of the available models has its own limitation, the combination of these models with each other can still pinpoint important contribution of DCs and macrophages in liver pathology.

## THE ROLE OF DENDRITIC CELLS AND MACROPHAGES IN CHRONIC LIVER DISEASES

### LIVER FIBROSIS PROGRESSION

Liver fibrosis is a common endpoint of many chronic liver diseases such as viral hepatitis, primary biliary cirrhosis, alcoholic and NASH, or autoimmune liver disorder (96, 97). To investigate liver fibrogenesis, several rodent models have been developed inducing toxic (CCL<sub>4</sub>), biliary (bile duct ligation), oxidative (TAA-induced), or metabolic (MCD/methionine choline deficient diet induced) liver damage (96, 97). The MCD diet contains high sucrose and fat (usually 40% sucrose and 10% fat) but lacks the amino acid methionine and the small molecule choline that are essential for hepatic  $\beta$ -oxidation and production/secretion of very low density lipoprotein (VLDL). As a result, lipids are deposited in the liver and steatosis, and NASH develops in these animals (98).

Remarkably, even though the molecular mechanisms leading to hepatic cell death are very different, the process of fibrogenesis and the cellular components involved share common hallmarks. Such common components, that have established their role in liver fibrosis, are the macrophages and the recruited inflammatory monocytes.

Major evidence for the involvement of macrophages in liver fibrosis is demonstrated in *in vivo* depletion studies using the CD11b-DTR system and the clodronate-liposome mediated cell depletion. In CCL<sub>4</sub> induced liver injury, the progression of fibrosis was attenuated in the absence of CD11b<sup>+</sup> cells and the number of HSC-derived myofibroblasts was greatly reduced (79).

The administration of clodronate liposomes similarly suggested that macrophages are pro-fibrogenic and affect the survival of HSCs via TNF and IL-1 induced NF- $\kappa$ B signaling (84, 99). Liver macrophage populations change during liver injury. One of the major changes is the recruitment of inflammatory monocytes to the injured liver and their differentiation toward tissue macrophages (24, 26, 28, 100). Resident KCs in liver injury rapidly secrete pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , TNF, CCL2, and CCL5 resulting in recruitment of multiple immune cells involving monocytes as well. The accumulation of circulating Ly6C<sup>hi</sup> monocytes within the liver is greatly dependent on CCR2/CCL2 and CCL1/CCR8 axis (100). The monocyte recruiting chemokines, however, not only originate from KCs but also from TLR-activated HSCs (101). Moreover, senescent hepatocytes and NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK) activation in hepatocytes lead to the release of numerous chemokines (86, 102). These chemokines can influence the migration or activation state of macrophages that in turn induce hepatocyte apoptosis. Accordingly, hepatocyte-specific expression of the NIK *in vivo* triggers massive liver inflammation and hepatocyte apoptosis leading to liver fibrosis (86). Thus, the macrophage–hepatocyte cross-talk seems to greatly influence cell recruitment and the activation state of macrophages, thereby affecting the progression of liver injury. The fact that in the above study KC/macrophage depletion using clodronate reversed NIK-induced damage, also strongly suggests this.

Monocyte recruitment to the injured liver can be observed early within 24 h after the induction of CCL<sub>4</sub> damage (25). These early recruited cells are CCR9<sup>+</sup>, colocalize and interact with CCR9<sup>+</sup> HSCs (27). Furthermore, these monocyte-derived macrophages are characterized as CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>iNOS<sup>+</sup> cells that exhibit profibrogenic properties via promoting HSC activation, Th1 cell differentiation, and TGF $\beta$  release (25, 26). In addition to this, profibrogenic Ly6C<sup>hi</sup> macrophages express PDGF, IL-13 and IL-4 that directly act on HSC derived myofibroblasts and induce ECM production (25, 26). Macrophages produce various lectins among them galectin-3 is required for TGF $\beta$  mediated myofibroblast activation and matrix production that further underline their profibrogenic capacity (103).

Another chemokine that affects the infiltrating monocytes is the fractalkine receptor (CX3CR1). Fractalkine is released by hepatocytes and HSCs during liver injury. It ensures the survival of infiltrating monocytes and influences their differentiation toward tissue macrophages (25). In the absence of CX3CR1, infiltrating monocytes develop into highly inflammatory macrophages that die early via apoptosis. This perpetuates further inflammation and recruitment of Ly6C<sup>hi</sup> cells. Additionally, CX3CR1 on KCs increase their IL-10 expression and reduces their TNF and TGF $\beta$  (104). Thus, fractalkine represent a negative feedback on the extension of liver inflammation through affecting KCs and the presence and destiny of Ly6C<sup>hi</sup> cells at least in the murine system. It requires future research to clarify how the changes in monocyte and macrophage subsets observed in mice are reflected in humans.

Regarding the M1–M2 classification of macrophages, during the progression phase of liver fibrosis and during fibrosis resolution, both types of cells are present in the liver side by side (105). Interestingly, based on histological analyses these M1 and M2 macrophages localize near to the fibrotic septa and could

indicate further undiscovered cross-talk among these cells in liver pathology. Of note, transcriptional analyses of macrophages that are present in the resolution phase display a profile that cannot be classified according to the M1/M2 nomenclature (28).

Accumulation of macrophages within the injured liver caused just partially by the recruited monocytes and their differentiation toward tissue macrophages. There is some evidence that local multiplication of resident and monocyte-derived macrophage population contribute to this process. Ki67 staining during CCL<sub>4</sub> mediated liver injury demonstrated the presence of proliferating KCs and monocyte-derived macrophages (28, 62). In most recent study, Listeria infection of the liver resulted in monocyte-derived macrophage proliferation via IL-4 and IL-33 (106). Whether these cytokines are also involved in this process during other types of liver injury and in humans as well remain to be elucidated.

Multiple animal studies reported that the number of dendritic cells, pre-DCs, and pDCs increase during the progression phase of liver fibrosis (76, 107). This raised the assumption that DCs might contribute to fibrosis progression. Using the CD11c-DTR model, it has been demonstrated that CD11c<sup>+</sup> cells provide a pro-inflammatory milieu by producing IL-1 $\beta$  and TNF during injury (76). Moreover, isolated cells contribute to HSC survival *in vitro* suggesting a clear profibrogenic capacity of these cells (37). This phenomenon, despite of the relatively broad CD11c expression among other myeloid cells as discussed above (Tables 1 and 2), was attributed to DCs.

Another study determined using the same CD11c-DTR system that DC depletion accelerates the development of fibrosis due to their influence on angiogenesis. DCs seem to be the source of the anti-angiogenic VEGF receptor 1 (also known as sFlt-1) and thus influence the bioavailability of VEGF during fibrogenesis (78). Notably, recent study has demonstrated that VEGF<sup>+</sup> inflammatory monocytes/monocyte derived macrophages colocalize with newly formed vessels in injured liver and pharmacological inhibition of CCL2 mediated recruitment of inflammatory monocytes reduces fibrosis-induced angiogenesis without affecting fibrosis progression (108). Thus, recruited monocytes/macrophages seem to counterbalance the anti-angiogenic property of DCs during fibrosis progression. Whether classical DCs or pDCs truly contribute to fibrosis progression or play other role during liver injury still remain to be clarified in the future.

### LIVER FIBROSIS REGRESSION

During liver fibrosis, the increased production of ECM is accompanied by high expression of MMPs and the presence of collagenase activity, suggesting alterations and adjustments in the fibrotic ECM. In fact, the fibrotic ECM seems to be different biochemically than ECM produced during a steady state turnover (109). In lung fibrosis, the pathological ECM activates fibroblastic cells to build further matrix indicating a positive cross-talk between fibroblast and matrix components (109). Also during liver fibrosis, heavily cross-linked, modified ECM could be identified (110); however, it remains to be elucidated whether similar regulatory loop as in the lung operates in liver fibrosis as well.

Importantly, after removal of the noxious agents causing liver damage, fibrotic scars degrade and normal liver architecture can be restored. This process is called resolution. While this functions well

in various animal models, in humans this seems to be a point of no return where fibrosis and cirrhosis progresses nonetheless (97).

In resolution, the role of macrophages has been demonstrated in multiple animal studies. Depletion of CD11b<sup>+</sup> cells during fibrosis progression, as above discussed, reduced scarring while during fibrosis resolution led to a failure in matrix degradation (79, 80). This strongly suggests the dominant presence of two functionally different macrophage populations. According to this, Ramachandran et al. have identified a subset of Ly6C<sup>low</sup> “restorative” macrophages during resolution (28). These cells originated from Ly6C<sup>hi</sup> recruited monocytes expressed MMPs including MMP9, MMP12, and phagocytosis related genes. Importantly, based on gene expression profiling, they could not be fit in the M1/M2 macrophage classification. Moreover, phagocytosis of liposomes or cellular debris by liver macrophages could recapitulate this type of restorative phenotype (28). In addition to this, recent study demonstrated that scar associated myeloid cells attract endothelial cells to the scar tissue via VEGF and that genetic ablation of VEGF in myeloid cells resulted in the increase of MMP2 and MMP13 and decrease of TIMP1 in the liver. While macrophages have not been unequivocally identified as myeloid cells in this study, the results indicate that the myeloid cells induced angiogenesis gears the balance toward fibrolysis (111). This is in line with recent findings that demonstrated that VEGF signaling plays key role during liver fibrosis resolution. Anti-VEGF antibody treatment during resolution led to impaired tissue repair. Mechanistically, VEGF regulated endothelial permeability, monocyte recruitment, and affected the CXCL9 and MMP13 expression of scar-associated macrophages. Importantly, depletion of Cfsr1<sup>+</sup> cells (including macrophages, monocytes, and DCs Table 2) impaired fibrosis resolution (112).

Based on these findings, macrophages can be grouped in profibrogenic and restorative macrophage populations beyond the M1/M2 scheme, a classification that might be much more beneficial for finding new targets for fibrosis therapy. However, multiple open questions remain concerning the balance of the heterogeneous population in liver diseases and the relation to each other. One molecule could provide a better understanding to the problem, the chemokine CX3CL1. Ramachandran et al. showed a higher expression of CX3CR1 within the restorative macrophage population, then in the profibrotic subset (28). Consistent with these findings, HSC and hepatocyte-derived fractalkine led to the induction of Arginase 1 in a mixed Kupffer-cell/macrophage cell population, a marker that has been associated with the fibrolytic macrophage subset (28, 104). Thus, an intriguing possibility is the progressive class switch between macrophage populations during fibrosis progression and regression. This possibility is underlined by the fact that the overall number of profibrogenic Ly6C<sup>hi</sup> macrophages strongly decreases in resolution despite the presence of their strong proliferation activity at early time points of fibrosis regression. At the same time, the number of Ly6C<sup>lo</sup> macrophages increases (28). Along this line, blocking CCL2 dependent liver infiltration by Ly6C<sup>hi</sup> monocytes during fibrosis regression leads to a higher relative amount of Ly6C<sup>lo</sup> macrophages (113). Moreover, the Ly6C<sup>lo</sup> macrophages could be shown to be postphagocytic and seem to appear in the phase of reduced hepatocyte death, further supporting the switch concept (28). It remains to be clarified

in the future how the macrophage populations interact and relate to each other. Similarly as the murine restorative macrophages in humans, this population is likely represented by the CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> cells (24, 26). They display phagocytic activity but as opposite to the murine cells express a variety of pro-inflammatory and pro-fibrogenic molecules as well.

Besides macrophages, DCs have also been implicated in liver fibrosis resolution. Jiao et al. have demonstrated that depletion of CD11c<sup>+</sup> cells leads to delay in fibrosis resolution and delayed clearance of activated HSCs. To more precisely pinpoint DCs in this process, adoptive transfer of purified DCs or expansion of endogenous DCs using FLT3L could accelerate regression. Moreover, DCs were the source of MMP9 and therefore seem to complement restorative macrophages in this process (75).

### NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the hepatic manifestation of metabolic syndrome that includes hypertension, hyperlipidemia, insulin resistance, and visceral adiposity, and shows a worldwide increasing tendency among chronic liver diseases (114, 115). In most cases, the liver steatosis is mild. However, up to one-fifth of the cases progresses toward NASH that is characterized by intrahepatic inflammation, increased steatosis with hepatocellular ballooning, and often accompanied by progressive fibrosis (114, 115). NASH is prone to the development of cirrhosis and liver cancer (115). While the precise cellular and molecular mechanisms of NASH are not yet fully understood, multiple studies have investigated macrophages and DCs in this disease.

Similarly as during liver fibrogenesis, in NASH, the two main components that show alterations are the response of macrophages/KCs and the recruited inflammatory monocytes. The key role of macrophages/KCs in NASH has been demonstrated in studies where these cells were specifically depleted using gadolinium chloride or clodronate liposomes (81–83, 85). In the absence of KCs, the steatohepatitis was markedly reduced. In addition to this, KCs display an M1 TNF expressing pro-inflammatory phenotype and increase triglyceride accumulation, decrease fatty acid oxidation and insulin responsiveness of hepatocytes (82, 83). KC-derived TNF production seems to be central in NASH development, as silencing liver TNF or using TNFR1/2 deficient animals attenuate liver steatosis compared with control wild-type animals (85, 116).

Multiple triggers have been identified for KC activation and for the induction of their pro-inflammatory cytokine production in NASH. TLR4 deficient animals showed reduced liver damage and KC depletion prevented the increase in TLR4 expression during MCD diet (81). Bacterial product induced KC activation is in accordance with clinical data that demonstrate bacterial translocation in NASH patients (117). Notably, TLR4 can be triggered not only by LPS but also by free fatty acids and high mobility group box-1 protein (HMGB1) that is increased in obesity and during hepatocyte injury. Not only LPS but also translocated nucleic acids have been implicated in the development of NASH via triggering TLR9 mediated KC activation and IL-1 $\beta$  release (118).

Lipidomics and mass spectrometry profiling revealed that KCs accumulate toxic lipids due to the dysregulation of lipid metabolism during high fat diet. Moreover, these lipid-loaded KCs

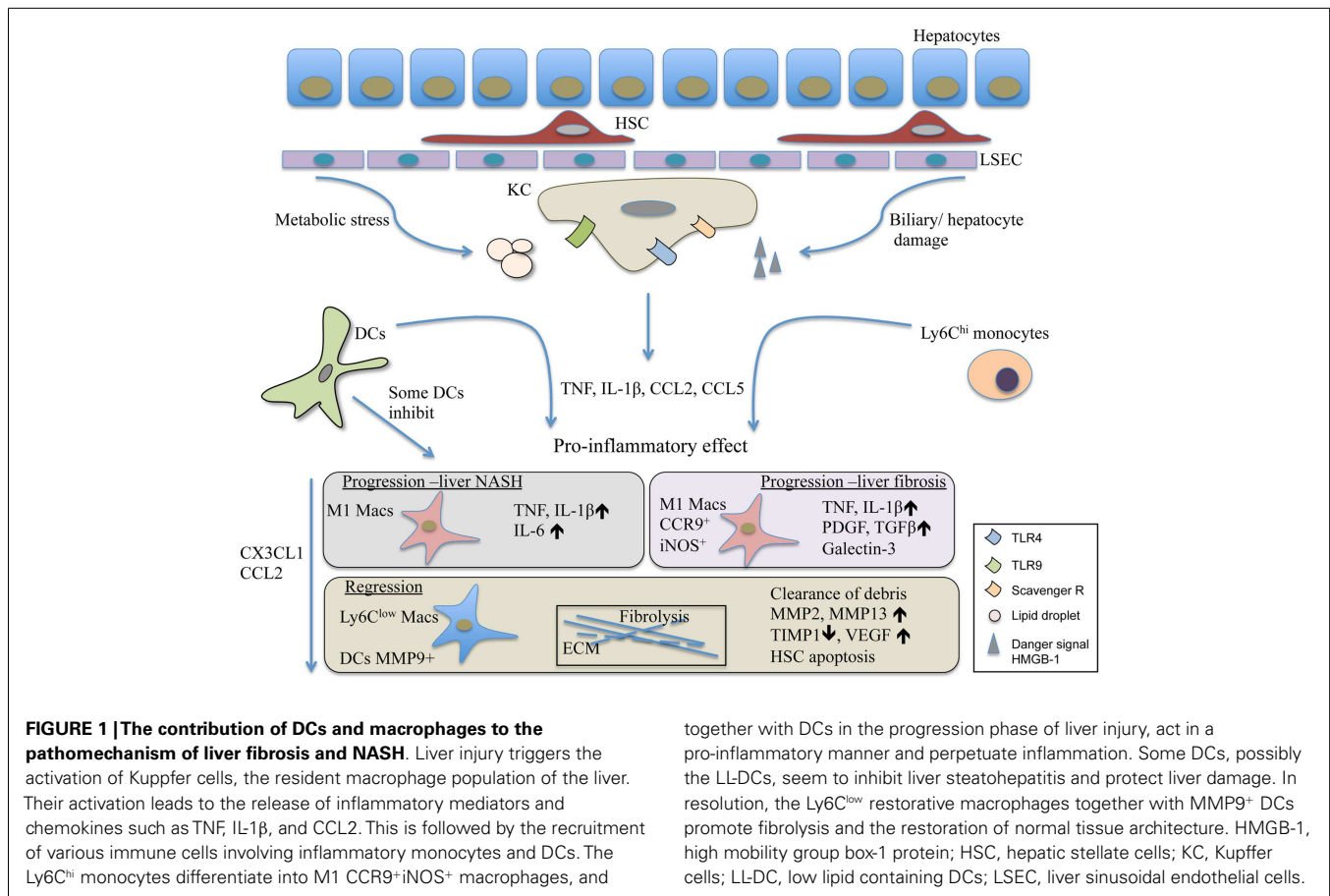
produce pro-inflammatory cytokines and chemokines (119). The balance between the M1 and M2 type of KCs seem to be a key for NASH progression. Mice fed with high-fat diet displayed a predominant M2 KC polarization, the apoptosis of M1 KCs and resistance to hepatocyte steatosis. *In vitro* experiments demonstrated that M2 macrophages release IL-10 that in return increase the sensitivity of M1 macrophages to undergo apoptosis (120).

The other hallmark of NASH is the increased monocyte recruitment to the injured liver. Activated KCs upregulate their MCP-1 expression that is the major chemokine involved in the recruitment of Ly6C<sup>hi</sup> cells. These Ly6C<sup>hi</sup> cells are pro-inflammatory and further perturb hepatic inflammation (85). Consequently, CCR2 deficient animals show decreased steatosis (113, 121). On the other hand, CCR2 signaling, when MCD diet is replaced with control diet, counteracts tissue resolution by perpetuating inflammation (113). This is a similar phenomenon as observed in fibrosis resolution (113).

Non-alcoholic steatohepatitis is associated with increased number of hepatic DCs identified by MHCII<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> cells (77). Depletion of these cells using CD11c-DTR mouse model exacerbates hepatic inflammation whereas during the resolution phase delays the reconstitution of normal tissue homeostasis. Importantly, these cells take up apoptotic cells, inhibit TLR expression, T cell expansion, and cytokine production by innate cells (77). This strongly suggests DCs as an important negative regulator of NASH inflammation. As opposite to this, another study has classified CD11c<sup>+</sup> cells during MCD-diet based on their lipid content (43). It remains to be clarified whether the tolerogenic LL-DC (low lipid DC) population is equivalent with the same immunoregulatory DCs in NASH as described by Henning et al. Of note, based on the surface marker expression profile of HL-DCs and LL-DCs, they rather seemed to be a part of a heterogeneous population, despite that all cells expressed various level of CD11c (43).

### SUMMARY AND CONCLUSION

Taken together, the liver represents a unique immunological niche within the body. Its parenchymal and non-parenchymal cells guard its tolerogenic and suppressive microenvironment while supporting its sentinel task of the portal and systemic circulation (**Figure 1**). Most liver injuries trigger the activation of resident KC/macrophage population that rapidly releases pro-inflammatory mediators such as TNF and IL-1 $\beta$ . This is followed by a chain of events that seem to be commonly shared by many injuries causing NASH and leading to liver fibrosis. The response involves the alterations within the myeloid cell composition primarily affecting macrophages. Importantly, other immune cells such as DCs, neutrophils, innate cells, and activated T cell are also recruited to the injured liver and play various roles in disease progression (6, 97). The exact role of liver DCs during chronic liver injury is yet to be determined. Nevertheless, they seem to be similarly pro-inflammatory as the Ly6C<sup>hi</sup> recruited monocytes. This feature is shared with infectious liver diseases; thus, it supposes to induce liver protecting immunity (2, 7). During chronic liver diseases, the overwhelming presence of pro-inflammatory immune cells together with liver damaging noxious agents eventually lead to extensive cell death and scar formation, a common outcome for chronic liver disorders. While KC activation alarms other immune



cells to travel to the liver, it influences metabolic processes and survival of hepatocytes. During disease progression, Ly6C<sup>hi</sup> cells seem to develop into Ly6C<sup>lo</sup> restorative macrophages. These cells, if the harmful agent vanishes, lead to resolution and can restore normal tissue architecture (Figure 1). Especially, in this process, DCs are complementing the macrophage population. In infection, recent report demonstrated that necroptosis of KCs was necessary to induce the Th2 mediated tissue repair (106) that remains to be tested to affect fibrosis resolution in the future. Equally important is the more detailed understanding of the factors involved in the switch from the pro-inflammatory to the restorative macrophage population.

Despite of the significant amount of data available in mice, we have just limited understanding about the course of events in human liver diseases. It will need future studies to analyze DC, monocyte, and macrophage populations within human liver samples not only phenotypically and functionally but also on genomic level in comparison with their murine counterparts. This can lead to better understanding of liver diseases but also for identifying novel therapeutic targets. A promising clinical perspective is to target chemokines in the early phase of the liver response to avoid inflammatory cell recruitment and further inflammation. One possibility is affecting the CCL2 axis. Currently, Cenriciviroc, an inhibitor of CCR2, is tested (Centaur study, phase 2 clinical trial, NCT:022117475) to attenuate fibrosis progression in NASH patients. Along this line, other chemokines that could affect

the differentiation of monocytes to inflammatory macrophages could be a possible target in the future. Additionally, DCs and restorative macrophages could become novel objectives for inducing fibrolysis and reversing liver damage. Notably, autologous transfer of expanded mononuclear cells to chronic viral hepatitis-associated fibrotic patients showed improved outcome as indicated by reduced Child-Pugh score (122), suggesting a great potential of myeloid cell transfer-based therapeutic procedures in the future.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

CE, NK contributed to the writing of the manuscript, prepared the tables. MK supervised the students and critically read the manuscript. VL-K developed the concept of the manuscript, supervised, and wrote the manuscript.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Alexander von Humboldt Foundation, Sofja Kovalevskaja Award to VL-K by a Deutsche Krebshilfe grant #111184 to MK.

## REFERENCES

- Ohtani O, Ohtani Y. Lymph circulation in the liver. *Anat Rec (Hoboken)* (2008) 291:643–52. doi:10.1002/ar.20681
- Jenne CN, Kubes P. Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol* (2013) 14:996–1006. doi:10.1038/ni.2691
- Racanelli V, Rehermann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology* (2006) 43:S54–62. doi:10.1002/hep.21060

4. Winau F, Quack C, Darmoise A, Kaufmann SH. Starring stellate cells in liver immunology. *Curr Opin Immunol* (2008) **20**:68–74. doi:10.1016/j.coi.2007.10.006
5. Puche JE, Saiman Y, Friedman SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Compr Physiol* (2013) **3**:1473–92. doi:10.1002/cphy.c120035
6. Thomson AW, Knolle PA. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat Rev Immunol* (2010) **10**:753–66. doi:10.1038/nri2858
7. Crispe IN. Immune tolerance in liver disease. *Hepatology* (2014) **60**:2109–17. doi:10.1002/hep.27254
8. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* (2007) **449**:419–26. doi:10.1038/nature06175
9. Hopp AK, Rupp A, Lukacs-Kornek V. Self-antigen presentation by dendritic cells in autoimmunity. *Front Immunol* (2014) **5**:55. doi:10.3389/fimmu.2014.00055
10. Ginhoux F, Liu K, Helft J, Bogunovic M, Greter M, Hashimoto D, et al. The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *J Exp Med* (2009) **206**:3115–30. doi:10.1084/jem.20091756
11. Miller JC, Brown BD, Shay T, Gautier EL, Jovic V, Cohain A, et al. Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage. *Nat Immunol* (2012) **13**:888–99. doi:10.1038/ni.2370
12. Yoneyama H, Narumi S, Zhang Y, Murai M, Baggolini M, Lanzavecchia A, et al. Pivotal role of dendritic cell-derived CXCL10 in the retention of T helper cell 1 lymphocytes in secondary lymph nodes. *J Exp Med* (2002) **195**:1257–66. doi:10.1084/jem.20011983
13. Barbier L, Tay SS, McGuffog C, Triccas JA, McCaughan GW, Bowen DG, et al. Two lymph nodes draining the mouse liver are the preferential site of DC migration and T cell activation. *J Hepatol* (2012) **57**:352–8. doi:10.1016/j.jhep.2012.03.023
14. Matsuno K, Kudo S, Ezaki T. The liver sinusoids as a specialized site for blood-lymph translocation of rat dendritic cells. *Adv Exp Med Biol* (1997) **417**:77–81. doi:10.1007/978-1-4757-9966-8\_13
15. Williams M, Ginhoux F, Jakubczak C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, et al. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol* (2014) **14**:571–8. doi:10.1038/nri3712
16. Bosma BM, Metselaar HJ, Mancham S, Boor PP, Kusters JG, Kazemier G, et al. Characterization of human liver dendritic cells in liver grafts and perfusates. *Liver Transpl* (2006) **12**:384–93. doi:10.1002/lt.20659
17. Kelly A, Fahey R, Fletcher JM, Keogh C, Carroll AG, Siddachari R, et al. CD141(+) myeloid dendritic cells are enriched in healthy human liver. *J Hepatol* (2014) **60**:135–42. doi:10.1016/j.jhep.2013.08.007
18. Liu K, Nussenzweig MC. Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev* (2010) **234**:45–54. doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00879.x
19. Guo S, Yang C, Mei F, Wu S, Luo N, Fei L, et al. Down-regulation of Z39Ig on macrophages by IFN-gamma in patients with chronic HBV infection. *Clin Immunol* (2010) **136**:282–91. doi:10.1016/j.clim.2010.03.007
20. Nascimento M, Huang SC, Smith A, Everts B, Lam W, Bassity E, et al. Ly6Chi monocyte recruitment is responsible for Th2 associated host-protective macrophage accumulation in liver inflammation due to schistosomiasis. *PLoS Pathog* (2014) **10**:e1004282. doi:10.1371/journal.ppat.1004282
21. Zigmund E, Samia-Grinberg S, Pasmanik-Chor M, Brazowski E, Shibolet O, Halpern Z, et al. Infiltrating monocyte-derived macrophages and resident kupffer cells display different ontogeny and functions in acute liver injury. *J Immunol* (2014) **193**:344–53. doi:10.4049/jimmunol.1400574
22. Strauss O, Dunbar PR, Bartlett A, Phillips A. The immunophenotype of antigen presenting cells of the mononuclear phagocyte system in normal human liver – a systematic review. *J Hepatol* (2015) **62**:458–68. doi:10.1016/j.jhep.2014.10.006
23. Karlmark KR, Weiskirchen R, Zimmermann HW, Gassler N, Ginhoux F, Weber C, et al. Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology* (2009) **50**:261–74. doi:10.1002/hep.22950
24. Liaskou E, Zimmermann HW, Li KK, Oo YH, Suresh S, Stamataki Z, et al. Monocyte subsets in human liver disease show distinct phenotypic and functional characteristics. *Hepatology* (2013) **57**:385–98. doi:10.1002/hep.26016
25. Karlmark KR, Zimmermann HW, Roderburg C, Gassler N, Wasmuth HE, Luedde T, et al. The fractalkine receptor CX(3)CR1 protects against liver fibrosis by controlling differentiation and survival of infiltrating hepatic monocytes. *Hepatology* (2010) **52**:1769–82. doi:10.1002/hep.23894
26. Zimmermann HW, Seidler S, Nattermann J, Gassler N, Hellerbrand C, Zernecke A, et al. Functional contribution of elevated circulating and hepatic non-classical CD14CD16 monocytes to inflammation and human liver fibrosis. *PLoS One* (2010) **5**:e11049. doi:10.1371/journal.pone.0011049
27. Chu PS, Nakamoto N, Ebinuma H, Usui S, Saeiki K, Matsumoto A, et al. C-C motif chemokine receptor 9 positive macrophages activate hepatic stellate cells and promote liver fibrosis in mice. *Hepatology* (2013) **58**:337–50. doi:10.1002/hep.26351
28. Ramachandran P, Pellicoro A, Vernon MA, Boulter L, Aucott RL, Ali A, et al. Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2012) **109**:E3186–95. doi:10.1073/pnas.1119964109
29. Liu K, Waskow C, Liu X, Yao K, Hoh J, Nussenzweig M. Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nat Immunol* (2007) **8**:578–83. doi:10.1038/ni1462
30. Liu K, Victoria GD, Schwickert TA, Guermontprez P, Meredith MM, Yao K, et al. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* (2009) **324**:392–7. doi:10.1126/science.1170540
31. Thomson AW, Geller DA, Gandhi C, Murase N, Demetris AJ, Beer-Stolz D. Hepatic antigen-presenting cells and regulation of liver transplant outcome. *Immunol Res* (2011) **50**:221–7. doi:10.1007/s12026-011-8223-0
32. Lukacs-Kornek V, Schuppan D. Dendritic cells in liver injury and fibrosis: shortcomings and promises. *J Hepatol* (2013) **59**:1124–6. doi:10.1016/j.jhep.2013.05.033
33. Xia S, Guo Z, Xu X, Yi H, Wang Q, Cao X. Hepatic microenvironment programs hematopoietic progenitor differentiation into regulatory dendritic cells, maintaining liver tolerance. *Blood* (2008) **112**:3175–85. doi:10.1182/blood-2008-05-159921
34. Kudo S, Matsuno K, Ezaki T, Ogawa M. A novel migration pathway for rat dendritic cells from the blood: hepatic sinusoids-lymph translocation. *J Exp Med* (1997) **185**:777–84. doi:10.1084/jem.185.4.777
35. Khanna A, Morelli AE, Zhong C, Takayama T, Lu L, Thomson AW. Effects of liver-derived dendritic cell progenitors on Th1- and Th2-like cytokine responses in vitro and in vivo. *J Immunol* (2000) **164**:1346–54. doi:10.4049/jimmunol.164.3.1346
36. Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Yamaguchi S, Sakamori R, Hiramatsu N, et al. Natural killer cell and hepatic cell interaction via NKG2A leads to dendritic cell-mediated induction of CD4 CD25 T cells with PD-1-dependent regulatory activities. *Immunology* (2007) **120**:73–82. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02479.x
37. Abe M, Tokita D, Raimondi G, Thomson AW. Endotoxin modulates the capacity of CpG-activated liver myeloid DC to direct Th1-type responses. *Eur J Immunol* (2006) **36**:2483–93. doi:10.1002/eji.200535767
38. Chen Y, Jiang G, Yang HR, Gu X, Wang L, Hsieh CC, et al. Distinct response of liver myeloid dendritic cells to endotoxin is mediated by IL-27. *J Hepatol* (2009) **51**:510–9. doi:10.1016/j.jhep.2009.04.026
39. Mikami Y, Mizuno S, Nakamoto N, Hayashi A, Sujino T, Sato T, et al. Macrophages and dendritic cells emerge in the liver during intestinal inflammation and predispose the liver to inflammation. *PLoS One* (2014) **9**:e84619. doi:10.1371/journal.pone.0084619
40. Lu L, Woo J, Rao AS, Li Y, Watkins SC, Qian S, et al. Propagation of dendritic cell progenitors from normal mouse liver using granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and their maturational development in the presence of type-1 collagen. *J Exp Med* (1994) **179**:1823–34. doi:10.1084/jem.179.6.1823
41. Bamboat ZM, Stableford JA, Plitas G, Burt BM, Nguyen HM, Welles AP, et al. Human liver dendritic cells promote T cell hyporesponsiveness. *J Immunol* (2009) **182**:1901–11. doi:10.4049/jimmunol.0803404
42. Haniffa M, Shin A, Bigley V, McGovern N, Teo P, See P, et al. Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity* (2012) **37**:60–73. doi:10.1016/j.immuni.2012.04.012
43. Ibrahim J, Nguyen AH, Rehman A, Ochi A, Jamal M, Graffeo CS, et al. Dendritic cell populations with different concentrations of lipid regulate tolerance and immunity in mouse and human liver. *Gastroenterology* (2012) **143**:1061–72. doi:10.1053/j.gastro.2012.06.003
44. Villadangos JA, Young L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunology* (2008) **29**:352–61. doi:10.1016/j.immuni.2008.09.002
45. Swiecki M, Gilfillan S, Vermi W, Wang Y, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cell ablation impacts early interferon responses and antiviral NK and

- CD8(+) T cell accrual. *Immunity* (2010) **33**:955–66. doi:10.1016/j.immuni.2010.11.020
46. Tokita D, Sumpter TL, Raimondi G, Zahorchak AF, Wang Z, Nakao A, et al. Poor allostimulatory function of liver plasmacytoid DC is associated with pro-apoptotic activity, dependent on regulatory T cells. *J Hepatol* (2008) **49**:1008–18. doi:10.1016/j.jhep.2008.07.028
  47. Goubier A, Dubois B, Gheith H, Joubert G, Villard-Truc F, Asselin-Paturel C, et al. Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity* (2008) **29**:464–75. doi:10.1016/j.immuni.2008.06.017
  48. Castellana A, Sumpter TL, Chen L, Tokita D, Thomson AW. NOD2 ligation subverts IFN- $\alpha$  production by liver plasmacytoid dendritic cells and inhibits their T cell allostimulatory activity via B7-H1 up-regulation. *J Immunol* (2009) **183**:6922–32. doi:10.4049/jimmunol.0900582
  49. Kingham TP, Chaudhry UI, Plitas G, Katz SC, Raab J, Dematteo RP. Murine liver plasmacytoid dendritic cells become potent immunostimulatory cells after Flt-3 ligand expansion. *Hepatology* (2007) **45**:445–54. doi:10.1002/hep.21457
  50. Krueger PD, Kim TS, Sung SS, Braciale TJ, Hahn YS. Liver-resident CD103+ dendritic cells prime antiviral CD8+ T cells in situ. *J Immunol* (2015) **194**:3213–22. doi:10.4049/jimmunol.1402622
  51. Huang LR, Wohlleber D, Reisinger F, Jenne CN, Cheng RL, Abdullah Z, et al. Intrahepatic myeloid-cell aggregates enable local proliferation of CD8(+) T cells and successful immunotherapy against chronic viral liver infection. *Nat Immunol* (2013) **14**:574–83. doi:10.1038/ni.2573
  52. Bowen DG, Zen M, Holz L, Davis T, McCaughan GW, Bertolino P. The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity. *J Clin Invest* (2004) **114**:701–12. doi:10.1172/JCI21593
  53. Yoneyama H, Matsuno K, Zhang Y, Murai M, Itakura M, Ishikawa S, et al. Regulation by chemokines of circulating dendritic cell precursors, and the formation of portal tract-associated lymphoid tissue, in a granulomatous liver disease. *J Exp Med* (2001) **193**:35–49. doi:10.1084/jem.193.1.35
  54. Link A, Hardie DL, Favre S, Britschgi MR, Adams DH, Sixt M, et al. Association of T-zone reticular networks and conduits with ectopic lymphoid tissues in mice and humans. *Am J Pathol* (2011) **178**:1662–75. doi:10.1016/j.ajpath.2010.12.039
  55. Schulz C, Gomez Perdiguerro E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, et al. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* (2012) **336**:86–90. doi:10.1126/science.1219179
  56. Gosselin D, Link VM, Romanoski CE, Fonseca GJ, Eichenfield DZ, Spann NJ, et al. Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. *Cell* (2014) **159**:1327–40. doi:10.1016/j.cell.2014.11.023
  57. Lavin Y, Winter D, Blecher-Gonen R, David E, Keren-Shaul H, Merad M, et al. Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. *Cell* (2014) **159**:1312–26. doi:10.1016/j.cell.2014.11.018
  58. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* (2013) **38**:792–804. doi:10.1016/j.immuni.2013.04.004
  59. Sieweke MH, Allen JE. Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. *Science* (2013) **342**:1242974. doi:10.1126/science.1242974
  60. Yona S, Kim KW, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* (2013) **38**:79–91. doi:10.1016/j.immuni.2012.12.001
  61. Kinoshita M, Uchida T, Sato A, Nakashima M, Nakashima H, Shono S, et al. Characterization of two F4/80-positive Kupffer cell subsets by their function and phenotype in mice. *J Hepatol* (2010) **53**:903–10. doi:10.1016/j.jhep.2010.04.037
  62. Bouwens L, Baekeland M, De Zanger R, Wisse E. Quantitation, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver. *Hepatology* (1986) **6**:718–22. doi:10.1002/hep.1840060430
  63. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol* (2013) **14**:986–95. doi:10.1038/ni.2705
  64. Kuniyasu Y, Marfani SM, Inayat IB, Sheikh SZ, Mehal WZ. Kupffer cells required for high affinity peptide-induced deletion, not retention, of activated CD8+ T cells by mouse liver. *Hepatology* (2004) **39**:1017–27. doi:10.1002/hep.20153
  65. Wiegard C, Frenzel C, Herkel J, Kallen KJ, Schmitt E, Lohse AW. Murine liver antigen presenting cells control suppressor activity of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Hepatology* (2005) **42**:193–9. doi:10.1002/hep.20756
  66. Breous E, Somanathan S, Vandenberghe LH, Wilson JM. Hepatic regulatory T cells and Kupffer cells are crucial mediators of systemic T cell tolerance to antigens targeting murine liver. *Hepatology* (2009) **50**:612–21. doi:10.1002/hep.23043
  67. Lee WY, Moriarty TJ, Wong CH, Zhou H, Strieter RM, Van Rooijen N, et al. An intravascular immune response to *Borrelia burgdorferi* involves Kupffer cells and iNKT cells. *Nat Immunol* (2010) **11**:295–302. doi:10.1038/ni.1855
  68. Beattie L, Phillips R, Brown N, Owens BM, Chauhan N, Dalton JE, et al. Interferon regulatory factor 7 contributes to the control of *Leishmania donovani* in the mouse liver. *Infect Immun* (2011) **79**:1057–66. doi:10.1128/IAI.00633-10
  69. Polakos NK, Cornejo JC, Murray DA, Wright KO, Treanor JJ, Crispe IN, et al. Kupffer cell-dependent hepatitis occurs during influenza infection. *Am J Pathol* (2006) **168**:1169–78. doi:10.2353/ajpath.2006.050875
  70. Tay SS, Wong YC, Roediger B, Sierro F, Lu B, McDonald DM, et al. Intrahepatic activation of naive CD4+ T cells by liver-resident phagocytic cells. *J Immunol* (2014) **193**:2087–95. doi:10.4049/jimmunol.1400037
  71. Ganz T. Macrophages and systemic iron homeostasis. *J Innate Immun* (2012) **4**:446–53. doi:10.1159/000336423
  72. Uwatoku R, Suematsu M, Ezaki T, Saiki T, Tsuiji M, Irimura T, et al. Kupffer cell-mediated recruitment of rat dendritic cells to the liver: roles of N-acetylgalactosamine-specific sugar receptors. *Gastroenterology* (2001) **121**:1460–72. doi:10.1053/gast.2001.29594
  73. Schmiegl J, Yang G, Franck RW, Van Rooijen N, Tsuiji M. Glycolipid presentation to natural killer T cells differs in an organ-dependent fashion. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005) **102**:1127–32. doi:10.1073/pnas.0408288102
  74. Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* (2014) **41**:21–35. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.013
  75. Jiao J, Sastre D, Fiel MI, Lee UE, Ghiassi-Nejad Z, Ginhoux F, et al. Dendritic cell regulation of carbon tetrachloride-induced murine liver fibrosis regression. *Hepatology* (2012) **55**:244–55. doi:10.1002/hep.24621
  76. Connolly MK, Bedrosian AS, Mallen-St Clair J, Mitchell AP, Ibrahim J, Stroud A, et al. In liver fibrosis, dendritic cells govern hepatic inflammation in mice via TNF- $\alpha$ . *J Clin Invest* (2009) **119**:3213–25. doi:10.1172/JCI37581
  77. Henning JR, Graffeo CS, Rehman A, Fallon NC, Zambirinis CP, Ochi A, et al. Dendritic cells limit fibroinflammatory injury in nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology* (2013) **58**:589–602. doi:10.1002/hep.26267
  78. Blois SM, Piccioni F, Freitag N, Tirado-Gonzalez I, Moschansky P, Lloyd R, et al. Dendritic cells regulate angiogenesis associated with liver fibrogenesis. *Angiogenesis* (2014) **17**:19–28. doi:10.1007/s10456-013-9382-5
  79. Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S, et al. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest* (2005) **115**:56–65. doi:10.1172/JCI22675
  80. Fallowfield JA, Mizuno M, Kendall TJ, Constandinou CM, Benyon RC, Duffield JS, et al. Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis. *J Immunol* (2007) **178**:5288–95. doi:10.4049/jimmunol.178.8.5288
  81. Rivera CA, Adegboyega P, Van Rooijen N, Tagalicud A, Allman M, Wallace M. Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* (2007) **47**:571–9. doi:10.1016/j.jhep.2007.04.019
  82. Huang W, Metlakunta A, Dedousis N, Zhang P, Sipula I, Dube JJ, et al. Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Diabetes* (2010) **59**:347–57. doi:10.2337/db09-0016
  83. Lanthier N, Molendi-Coste O, Cani PD, Van Rooijen N, Horsmans Y, Leclercq IA. Kupffer cell depletion prevents but has no therapeutic effect on metabolic and inflammatory changes induced by a high-fat diet. *FASEB J* (2011) **25**:4301–11. doi:10.1096/fj.11-189472
  84. Sunami Y, Leithauser F, Gul S, Fiedler K, Guldiken N, Espenlaub S, et al. Hepatic activation of IKK/NF- $\kappa$ B signaling induces liver fibrosis via macrophage-mediated chronic inflammation. *Hepatology* (2012) **56**:1117–28. doi:10.1002/hep.25711
  85. Tosello-Tramont AC, Landes SG, Nguyen V, Novobrantseva TI, Hahn YS. Kupffer cells trigger nonalcoholic steatohepatitis development in diet-induced mouse model through tumor necrosis factor- $\alpha$  production. *J Biol Chem* (2012) **287**:40161–72. doi:10.1074/jbc.M112.417014
  86. Shen H, Sheng L, Chen Z, Jiang L, Su H, Yin L, et al. Mouse hepatocyte overexpression of NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK) triggers fatal macrophage-dependent liver injury and fibrosis. *Hepatology* (2014) **60**:2065–76. doi:10.1002/hep.27348



87. Chow A, Brown BD, Merad M. Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. *Nat Rev Immunol* (2011) **11**:788–98. doi:10.1038/nri3087
88. Hume DA. Applications of myeloid-specific promoters in transgenic mice support in vivo imaging and functional genomics but do not support the concept of distinct macrophage and dendritic cell lineages or roles in immunity. *J Leukoc Biol* (2011) **89**:525–38. doi:10.1189/jlb.0810472
89. Bar-On L, Jung S. Defining in vivo dendritic cell functions using CD11c-DTR transgenic mice. *Methods Mol Biol* (2010) **595**:429–42. doi:10.1007/978-1-60761-421-0\_28
90. Torres PF, Slegers TP, Peek R, Van Rooijen N, Van Der Gaag R, Kijlstra A, et al. Changes in cytokine mRNA levels in experimental corneal allografts after local clodronate-liposome treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (1999) **40**:3194–201.
91. Hochweller K, Striegler J, Hammerling GJ, Garbi N. A novel CD11c-DTR transgenic mouse for depletion of dendritic cells reveals their requirement for homeostatic proliferation of natural killer cells. *Eur J Immunol* (2008) **38**:2776–83. doi:10.1002/eji.200838659
92. Meredith MM, Liu K, Darrasse-Jeze G, Kamphorst AO, Schreiber HA, Guermontprez P, et al. Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btb4d) defines the classical dendritic cell lineage. *J Exp Med* (2012) **209**:1153–65. doi:10.1084/jem.20112675
93. Meredith MM, Liu K, Kamphorst AO, Idoyaga J, Yamane A, Guermontprez P, et al. Zinc finger transcription factor zDC is a negative regulator required to prevent activation of classical dendritic cells in the steady state. *J Exp Med* (2012) **209**:1583–93. doi:10.1084/jem.20121003
94. Satpathy AT, Kc W, Albring JC, Edelson BT, Kretzer NM, Bhattacharya D, et al. Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages. *J Exp Med* (2012) **209**:1135–52. doi:10.1084/jem.20120030
95. Schraml BU, Van Blijswijk J, Zelenay S, Whitney PG, Filby A, Acton SE, et al. Genetic tracing via DNGR-1 expression history defines dendritic cells as a hematopoietic lineage. *Cell* (2013) **154**:843–58. doi:10.1016/j.cell.2013.07.014
96. Liedtke C, Luedde T, Sauerbruch T, Scholten D, Streetz K, Tacke F, et al. Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. *Fibrogenesis Tissue Repair* (2013) **6**:19. doi:10.1186/1755-1536-6-19
97. Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, Fallowfield JA. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol* (2014) **14**:181–94. doi:10.1038/nri3623
98. Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* (2012) **18**:2300–8. doi:10.3748/wjg.v18.i19.2300
99. Pradere JP, Kluwe J, De Minicis S, Jiao JJ, Gwak GY, Dapito DH, et al. Hepatic macrophages but not dendritic cells contribute to liver fibrosis by promoting the survival of activated hepatic stellate cells in mice. *Hepatology* (2013) **58**:1461–73. doi:10.1002/hep.26429
100. Tacke F, Zimmermann HW. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *J Hepatol* (2014) **60**:1090–6. doi:10.1016/j.jhep.2013.12.025
101. Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, et al. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med* (2007) **13**:1324–32. doi:10.1038/nm1663
102. Irvine KM, Skoien R, Bokil NJ, Melino M, Thomas GP, Loo D, et al. Senescent human hepatocytes express a unique secretory phenotype and promote macrophage migration. *World J Gastroenterol* (2014) **20**:17851–62. doi:10.3748/wjg.v20.i47.17851
103. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP, Iredale JP, et al. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006) **103**:5060–5. doi:10.1073/pnas.0511167103
104. Aoyama T, Inokuchi S, Brenner DA, Seki E. CX3CL1-CX3CR1 interaction prevents carbon tetrachloride-induced liver inflammation and fibrosis in mice. *Hepatology* (2010) **52**:1390–400. doi:10.1002/hep.23795
105. Beljaars L, Schippers M, Reker-Smit C, Martinez FO, Helming L, Poelstra K, et al. Hepatic localization of macrophage phenotypes during fibrogenesis and resolution of fibrosis in mice and humans. *Front Immunol* (2014) **5**:430. doi:10.3389/fimmu.2014.00430
106. Bleriot C, Dupuis T, Jouvion G, Eberl G, Disson O, Lecuit M. Liver-resident macrophage necroptosis orchestrates type 1 microbicidal inflammation and type-2-mediated tissue repair during bacterial infection. *Immunity* (2015) **42**:145–58. doi:10.1016/j.immuni.2014.12.020
107. Bleier JI, Katz SC, Chaudhry UI, Pillarisetty VG, Kingham TP III, Shah AB, et al. Biliary obstruction selectively expands and activates liver myeloid dendritic cells. *J Immunol* (2006) **176**:7189–95. doi:10.4049/jimmunol.176.12.7189
108. Ehling J, Bartneck M, Wei X, Gremse F, Fech V, Mockel D, et al. CCL2-dependent infiltrating macrophages promote angiogenesis in progressive liver fibrosis. *Gut* (2014) **63**:1960–71. doi:10.1136/gutjnl-2013-306294
109. Parker MW, Rossi D, Peterson M, Smith K, Sikstrom K, White ES, et al. Fibrotic extracellular matrix activates a profibrotic positive feedback loop. *J Clin Invest* (2014) **124**:1622–35. doi:10.1172/JCI171386
110. Issa R, Zhou X, Constandinou CM, Fallowfield J, Millward-Sadler H, Gaca MD, et al. Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking. *Gastroenterology* (2004) **126**:1795–808. doi:10.1053/j.gastro.2004.03.009
111. Kantari-Mimoun C, Castells M, Klose R, Meinecke AK, Lemberger UJ, Rautou PE, et al. Resolution of liver fibrosis requires myeloid cell-driven sinusoidal angiogenesis. *Hepatology* (2015). doi:10.1002/hep.27635
112. Yang L, Kwon J, Popov Y, Gajdos GB, Ordog T, Brekken RA, et al. Vascular endothelial growth factor promotes fibrosis resolution and repair in mice. *Gastroenterology* (2014) **146**:1339–1350 e1331. doi:10.1053/j.gastro.2014.01.061
113. Baeck C, Wei X, Bartneck M, Fech V, Heymann F, Gassler N, et al. Pharmacological inhibition of the chemokine C-C motif chemokine ligand 2 (monocyte chemoattractant protein 1) accelerates liver fibrosis regression by suppressing Ly-6C(+) macrophage infiltration in mice. *Hepatology* (2014) **59**:1060–72. doi:10.1002/hep.26783
114. Loomba R, Sanyal AJ. The global NAFLD epidemic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* (2013) **10**:686–90. doi:10.1038/nrgastro.2013.171
115. Michelotti GA, Machado MV, Diehl AM. NAFLD, NASH and liver cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* (2013) **10**:656–65. doi:10.1038/nrgastro.2013.183
116. Tomita K, Tamiya G, Ando S, Ohsumi K, Chiyo T, Mizutani A, et al. Tumour necrosis factor alpha signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Gut* (2006) **55**:415–24. doi:10.1136/gut.2005.071118
117. Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R, et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* (2009) **49**:1877–87. doi:10.1002/hep.22848
118. Miura K, Kodama Y, Inokuchi S, Schnabl B, Aoyama T, Ohnishi H, et al. Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1beta in mice. *Gastroenterology* (2010) **139**:323–334 e327. doi:10.1053/j.gastro.2010.03.052
119. Leroux A, Ferrere G, Godie V, Cailleux F, Renoud ML, Gaudin F, et al. Toxic lipids stored by Kupffer cells correlates with their pro-inflammatory phenotype at an early stage of steatohepatitis. *J Hepatol* (2012) **57**:141–9. doi:10.1016/j.jhep.2012.02.028
120. Wan J, Benkdane M, Teixeira-Clerc F, Bonnafous S, Louvet A, Lafdil F, et al. M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis: a protective mechanism against alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* (2014) **59**:130–42. doi:10.1002/hep.26607
121. Baeck C, Wehr A, Karlmark KR, Heymann F, Vucur M, Gassler N, et al. Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. *Gut* (2012) **61**:416–26. doi:10.1136/gutjnl-2011-300304
122. Schuppan D, Kim YO. Evolving therapies for liver fibrosis. *J Clin Invest* (2013) **123**:1887–901. doi:10.1172/JCI66028

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 27 February 2015; accepted: 30 March 2015; published online: 20 April 2015.  
Citation: Eckert C, Klein N, Kornek M and Lukacs-Kornek V (2015) The complex myeloid network of the liver with diverse functional capacity at steady state and in inflammation. *Front. Immunol.* **6**:179. doi: 10.3389/fimmu.2015.00179  
This article was submitted to Antigen Presenting Cell Biology, a section of the journal *Frontiers in Immunology*.

Copyright © 2015 Eckert, Klein, Kornek and Lukacs-Kornek. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.