

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-  
EPPENDORF**

Abteilung für Virus Immunologie, Leibniz-Institut für Virologie

Wissenschaftlicher Direktor: Herr Prof. Dr. Thomas Dobner  
Administrative Direktorin: Frau Katja Linke

Abteilungsleiter Virus Immunologie: Herr Prof. Dr. med. Marcus Altfeld

**Die Expression von CD49a kennzeichnet eine Untergruppe intrahepatischer  
Makrophagen beim Menschen**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Hanna-Lisa Goebels  
Henstedt-Ulzburg

Hamburg 2022

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:** 13.04.2023

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:** Prof. Dr. Linda Diehl

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:** Prof. Dr. Christoph Schramm

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Originalarbeit der Publikationsdissertation</b>	4
<b>2. Zusammenfassung der Publikationsdissertation</b>	17
2.1. Einleitung	17
2.2. Material und Methoden	18
2.2.1. Durchflusszytometrie	19
2.2.2. Immunfluoreszenz	19
2.2.3. Analyse der intrazellulären Zytokine	20
2.2.4. Statistische Analyse	20
2.3. Ergebnisse	20
2.3.1. CD49a wird von intrahepatischen Makrophagen exprimiert	19
2.3.2. CD49a, VSIG4 und MARCO dienen als Marker für intrahepatische Makrophagen	21
2.3.3. Intrahepatische Makrophagen zeigen eine höhere Aktivität als periphere Makrophagen	20
2.4. Diskussion	22
2.5. Zusammenfassung der Ergebnisse	25
2.6. Result summary	25
2.7. Abkürzungsverzeichnis	26
2.8. Literaturverzeichnis	27
<b>3. Erklärung des Eigenanteils</b>	29
<b>4. Danksagung</b>	30
<b>5. Lebenslauf</b>	31
<b>6. Eidesstattliche Versicherung</b>	32

## **1. Originalarbeit der Publikationsdissertation.**



# CD49a Expression Identifies a Subset of Intrahepatic Macrophages in Humans

Glòria Martrus<sup>1†</sup>, Hanna Goebels<sup>1†</sup>, Annika E. Langeneckert<sup>1</sup>, Janine Kah<sup>2,3</sup>, Felix Flomm<sup>1</sup>, Annerose E. Ziegler<sup>1</sup>, Annika Niehrs<sup>1</sup>, Sebastian M. Löbl<sup>1</sup>, Kristina Russu<sup>1</sup>, Leonard U. Hess<sup>1</sup>, Wilhelm Salzberger<sup>1</sup>, Tobias Poch<sup>2,4</sup>, Björn Nashan<sup>5,6</sup>, Christoph Schramm<sup>2,4</sup>, Karl J. Oldhafer<sup>7</sup>, Maura Dandri<sup>2</sup>, Martina Koch<sup>5,8</sup>, Sebastian Lunemann<sup>1†</sup> and Marcus Altfeld<sup>1\*†</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Simon Yona,  
University College London,  
United Kingdom

### Reviewed by:

Ehud Zigmond,  
Tel Aviv Sourasky Medical  
Center, Israel  
Prakash Ramachandran,  
University of Edinburgh,  
United Kingdom

### \*Correspondence:

Marcus Altfeld  
marcus.altfeld@leibniz-hpi.de

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work

### Specialty section:

This article was submitted to  
Antigen Presenting Cell Biology,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

Received: 11 December 2018

Accepted: 16 May 2019

Published: 07 June 2019

### Citation:

Martrus G, Goebels H,  
Langeneckert AE, Kah J, Flomm F,  
Ziegler AE, Niehrs A, Löbl SM,  
Russu K, Hess LU, Salzberger W,  
Poch T, Nashan B, Schramm C,  
Oldhafer KJ, Dandri M, Koch M,  
Lunemann S and Altfeld M (2019)  
CD49a Expression Identifies a Subset  
of Intrahepatic Macrophages in  
Humans. *Front. Immunol.* 10:1247.  
doi: 10.3389/fimmu.2019.01247

<sup>1</sup> Heinrich Pette Institute, Leibniz Institute for Experimental Virology, Hamburg, Germany, <sup>2</sup> Internal Department of Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, <sup>3</sup> Center of Internal Medicine II, Brandenburg Medical School, University Hospital Brandenburg, Brandenburg, Germany, <sup>4</sup> Martin Zeitz Center for Rare Diseases, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, <sup>5</sup> Department of Hepatobiliary and Transplant Surgery, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, <sup>6</sup> Clinic of Hepato-Pancreatico-Biliary Surgery and The Transplantation Center, First Affiliated Hospital, School of Life Sciences and Medical Center, University of Sciences & Technology of China, Hefei, China, <sup>7</sup> Department of General & Abdominal Surgery, Asklepios Hospital Barmbek, Semmelweis University of Medicine, Hamburg, Germany, <sup>8</sup> Department for General, Visceral and Transplant Surgery, University Hospital Mainz, Mainz, Germany

Macrophages play central roles in inflammatory reactions and initiation of immune responses during infections. More than 80% of total tissue macrophages are described to be located in the liver as liver-resident macrophages, also named Kupffer cells (KCs). While studies in mice have established a central role of liver-resident KCs in regulating liver inflammation, their phenotype and function are not well-characterized in humans. Comparing paired human liver and peripheral blood samples, we observed significant differences in the distribution of macrophage (M $\phi$ ) subsets, with lower frequencies of CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>lo</sup> and higher frequencies of CD14<sup>int-hi</sup>CD16<sup>int</sup> M $\phi$  in human livers. Intrahepatic M $\phi$  consisted of diverse subsets with differential expression of CD49a, a liver-residency marker previously described for human and mice NK cells, and VSIG4 and/or MARCO, two recently described human tissue M $\phi$  markers. Furthermore, intrahepatic CD49a<sup>+</sup> M $\phi$  expressed significantly higher levels of maturation and activation markers, exhibited higher baseline levels of TNF- $\alpha$ , IL-12, and IL-10 production, but responded less to additional *in vitro* TLR stimulation. In contrast, intrahepatic CD49a<sup>-</sup> M $\phi$  were highly responsive to stimulation with TLR ligands, similar to what was observed for CD49a<sup>-</sup> monocytes (MOs) in peripheral blood. Taken together, these studies identified populations of CD49a<sup>+</sup>, VSIG4<sup>+</sup>, and/or MARCO<sup>+</sup> M $\phi$  in human livers, and demonstrated that intrahepatic CD49a<sup>+</sup> M $\phi$  differed in phenotype and function from intrahepatic CD49a<sup>-</sup> M $\phi$  as well as from peripheral blood-derived monocytes.

**Keywords:** monocytes/macrophages, human liver, tissue residency, cell activation, CD49a

## INTRODUCTION

Under homeostatic conditions, the liver represents an immune-privileged and tolerogenic organ, reflected by a general lack of immune responses induced by foreign antigens [with some exceptions, such as schistosomiasis (1)], and low rates of liver allotransplantation rejections (2, 3). The liver has however been suggested to play a central role in the regulation of host immune defenses (4, 5), as both gastrointestinal portal and systemic blood circulations reach the liver, exposing liver-resident immune cells to antigens (6). Livers contain a large population of non-parenchymal immune cells, including hepatic stellate cells (HSC), dendritic cells (DCs), macrophages (M $\phi$ ), Natural Killer (NK) cells and liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) (7). M $\phi$  and LSECs can absorb pathogens and molecules that entered the portal circulation after gastrointestinal translocation, as these cells are located within liver sinusoids, in close contact with the portal blood stream (8). Once peripheral blood monocytes migrate into tissues, they have been traditionally defined as M $\phi$ , and serve as antigen presenting cells (APCs). In peripheral blood, MOs have been defined as CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>lo</sup> (classical), CD14<sup>int-hi</sup>CD16<sup>int</sup> (intermediate), or CD14<sup>lo</sup>CD16<sup>hi</sup> (non-classical) monocytes (9), with distinct functional capacities. In contrast, little is known about liver-derived human M $\phi$ , and the markers that characterize these cells. M $\phi$  in liver have been suggested to have dual origins, as they have the capacity to self-renew or to differentiate from recruited infiltrating peripheral blood monocytes (MOs) (10).

Liver-resident NK and T cells express CD49a, the alpha 1 subunit of  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 integrin, which retains cells in this organ by binding to two abundant molecules in the liver, collagen IV and laminin (11–15). Moreover, V-set and Ig domain-containing 4 (VSIG4), a molecule from the B7-related co-signaling family that binds to the complement component 3b (C3b and iC3b), was identified as a cellular marker for liver-derived Kupffer cells (KC) in mice, and was also suggested to be a marker for human macrophages residing in peritoneum and livers (16–22). Recently, an approach using RNA single cell sequencing of human liver tissues confirmed VSIG4 and identified the pattern recognition receptor (PRR) MARCO as specific markers of intrahepatic M $\phi$  (ihM $\phi$ ) (23). In mouse models, the presence of VSIG4<sup>+</sup> KCs was critical in regulating responses of liver-resident T- and NKT-cells (24), suggesting a role of this molecule in limiting inflammatory tissue damage. MARCO<sup>+</sup> cells were detected mainly in periportal areas of the liver and had lower responses to LPS/IFN- $\gamma$  stimulation (23). However, little is known about the expression of CD49a, VSIG4, and MARCO on human liver-derived M $\phi$ , and the functionality of these cells.

In this study, matched peripheral blood MOs and intrahepatic M $\phi$  (ihM $\phi$ ) were phenotypically and functionally characterized to identify specific markers expressed by these different subpopulations. Our studies identified a population of CD49a<sup>+</sup>, VSIG4<sup>+</sup>, and/or MARCO<sup>+</sup> ihM $\phi$  in human livers. CD49a<sup>+</sup> ihM $\phi$  exhibited cytokine responses at baseline and responded little to additional stimulation with TLR ligands. Altogether, our data suggest that CD49a serves as a marker to define intrahepatic

M $\phi$  and that CD49a<sup>+</sup> ihM $\phi$  might play a role in regulating liver inflammation.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Cohort

Matched peripheral blood and liver tissue samples were obtained from individuals undergoing liver transplant surgery (Department of Hepatobiliary and Transplant Surgery, University Medical Center Hamburg-Eppendorf) or surgical tumor-free liver tissue resection due to liver metastases (Department of General and Visceral Surgery at the Asklepios Clinic Hamburg-Barmbek). Demographics of individuals included in this study for each experiment set are shown in **Supplementary Tables 1–4**. Liver samples from a total of 33 individuals were used to generate the data in this study. Studies were approved by the Institutional Review Board of the medical faculty at the University of Hamburg (PV4898, PV4081, PV4780, and WF-021/11). All study subjects provided written informed consent.

### Cell Preparation

Peripheral blood samples from each individual participating in this study were collected before or during surgery and processed within 2 h. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) samples were prepared using Ficoll-Hypaque centrifugation (Biocoll), as described previously (25, 26). Collected liver tissue was stored on ice for a maximum of 30 min before processing and mechanically sliced into pieces of 0.5–1 cm<sup>3</sup> under BSL3\*\* laboratory conditions (Biosafety Level 3\*\*), as described (14, 27). If the amount of isolated liver cells obtained was higher than  $1 \times 10^9$  total cells, an additional purification step was performed. In brief, cells were diluted with PBS, centrifuged twice at 400g for 4 min at room temperature (RT) and supernatant containing intrahepatic leukocytes (IHLs) was recovered and transferred to a new tube. PBS was added to obtain a final volume in the tube of 50 mL, cells were centrifuged at 400g for 7 min and supernatant was discarded. This washing step was repeated twice. Cell pellets were resuspended in 4.5 mL PBS (final volume) and mixed with OptiPrep solution (Sigma-Aldrich) in a 15 mL falcon tube. 1 mL of PBS was carefully layered on top of the cell/Optiprep suspension and tubes were centrifuged for 20 min at 400g without breaks. The interphase containing the erythrocyte/leukocyte populations was collected and cells were washed once with PBS. The cell pellet containing intrahepatic leukocytes (IHLs) was treated with ACK Lysis buffer (Sarsted AG&Co) following manufacturer's instructions and finally resuspended in RPMI+10% FBS for subsequent experiments. Enzymatic treatment was not used to avoid cleavage and degradation of cell surface receptors [data not shown and (28)].

### Phenotyping of Monocytes/ M $\phi$ Populations Using Flow Cytometry

Freshly isolated IHLs and PBMCs ( $2 \times 10^6$  cells) were used for flow cytometry phenotyping and the same voltages and settings were applied on paired samples. For the surface staining we

used the antibodies summarized in **Supplementary Table 5**. Zombie aqua (Biolegend) was used to discriminate dead cells. Cells were analyzed using a BD LSR Fortessa and further analyses were performed with FlowJo v10 software. The same gating strategy was applied for PBMCs and IHLs from the same donor in the analysis of monocytes/M $\phi$  populations (**Supplementary Figures 1A,B**). t-SNE analyses were performed using the Cytobank (USA) platform. The corresponding isotype controls for VSIG4, CD49a and MARCO staining are shown in **Supplementary Figure 2A** and **Supplementary Table 5**. MARCO was not well-detectable in unstimulated freshly isolated samples using flow cytometry. To test for antibody specificity, freshly isolated PBMCs were polarized with recombinant human M-CSF (Peprotech) at 40 ng/mL for 5 days, followed by IL-10 stimulation (Peprotech) at 10 ng/mL for 48 h, as recommended by the vendor (ThermoFisher). Cells were stained to define monocytes/macrophages and MARCO (**Supplementary Figure 2B**).

## Immunofluorescence

To visualize the expression of surface markers CD49a CD68, MARCO, and VSIG4 on M $\phi$ , frozen human liver biopsies were cut in 5  $\mu$ m sections. To control for tissue and cellular morphology, 12  $\mu$ m slides were also prepared and stained with Hoechst, as described below. Tissue slides were fixed and permeabilized in acetone for 10 min at RT, washed three times with 1  $\times$  PBS, blocked for 30 min with 10% BSA in PBS and subsequently incubated overnight at 4°C with the following antibodies: CD49a (FITC; TS217; Biolegend, dilution 1:100), CD68 (AF 405 or PE; JO217; Santa Cruz; dilution 1:100), MARCO (unlabeled; polyclonal; Invitrogen; 1:100) and VSIG4 (APC or PE-Cy7; JAV4; eBioscience; dilution 1:100). When MARCO staining was performed, slides were washed three times with 0.1%BSA/1  $\times$  PBS for 5 min each and a secondary goat anti-rabbit antibody was used (AF633; Invitrogen; 1:400). Tissue sections that were not stained with CD68-AF405 antibody were stained with Hoechst for 2 min. Tissue slides were mounted with fluorescein mounting media (Dako, Glostrup, Denmark) and visualized by confocal laser scanning microscopy (Microscope Biorvo BZ-9000, Keyence, Japan) using the same settings for all recorded areas. Unstained samples were used to assess the autofluorescence background of tissue samples and used to set the sensitivity of detectors (**Supplementary Figure 3A**). Fiji (ImageJ) was used to analyze all data, using a macro (Fiji measurement analyzer) (**Supplementary Code 1**), aiming at first applying a positive mask on CD68<sup>+</sup> signal ( $n = 561$ ) and then calculating the signal presence and intensity on CD68<sup>+</sup> signal for VSIG4, MARCO and CD49a. The specificity of the binary definition of signals and their intensities defined by the macro on Fiji showed a reliable gating strategy (**Supplementary Figure 4**).

## Intracellular Cytokine Staining

Functional responses of monocytes and macrophages to TLR4 or TLR7/8 ligands were assessed in cell cultures of PBMCs or OptiPrep-isolated IHLs stimulated with either LPS (100 ng/mL, Invivogen) or CL097 (1  $\mu$ g/mL, Invivogen) in a medium containing BFA (5  $\mu$ g/mL, Sigma Aldrich), as previously

described (29). Unstimulated cells were used as baseline control. At 16 h post-stimulation, cells were prepared for intracellular cytokine staining following the manufacturer's instructions (FIX & PERM<sup>®</sup> Cell Fixation & Cell Permeabilization Kit, Thermo Fisher Scientific) and antibodies from **Supplementary Table 5**. Cells were washed and measured using a BD LSR Fortessa. Further analyses and gating strategies were performed with FlowJo v10 software.

## Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using Prism v7.03 (GraphPad Software Inc.). Since the sample size for the individual comparisons was under  $n = 30$ , data was analyzed as non-normally distributed (non-parametric). Matched analyses were performed using Wilcoxon matched pair signed rank test for comparisons and adjusted for multiple comparisons (FDR) using the original FDR method of Benjamini and Hochberg ( $Q = 1\%$ ). When samples were not paired, Mann-Whitney tests were applied. When not otherwise stated,  $p$  values  $< 0.05$  were considered as statistically significant and were depicted in the corresponding figures.

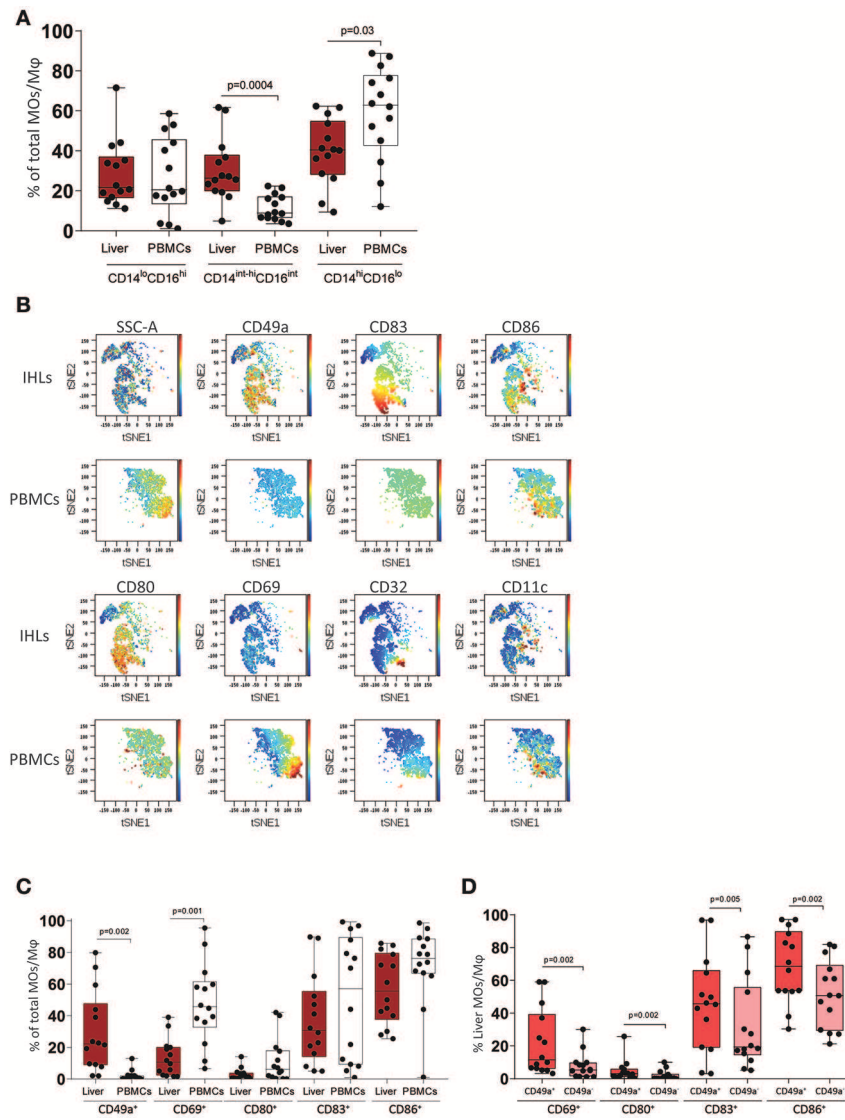
## RESULTS

### CD49a Is Expressed by Intrahepatic M $\phi$

Monocytes and M $\phi$  play a pivotal role in liver homeostasis and initiation of immune responses. We analyzed and compared the phenotypical profile of human peripheral blood monocytes (pbMOs) and intrahepatic M $\phi$  (ihM $\phi$ ) using flow cytometry. While no differences were observed in the CD14<sup>lo</sup>CD16<sup>hi</sup> subset between liver and peripheral blood (**Figure 1A**), the proportion of CD14<sup>int-hi</sup>CD16<sup>int</sup> cells was significantly upregulated and the proportion of CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>lo</sup> cells downregulated in liver-derived cells compared to peripheral blood (**Figure 1A**). In a representative t-SNE plot, monocytes and M $\phi$  from PBMCs and liver diverged substantially, specially due to the differential expression of CD49a, CD80, CD83, CD69, and CD86 (**Figure 1B**, **Supplementary Figures 1C,D**).

The activation status of monocytes/M $\phi$  was analyzed using CD69 (30), CD83 (31), CD80 (B7.1), and CD86 (B7.2) (32). Compared to pbMOs, ihM $\phi$  contained a lower proportion of cells expressing activation markers such as CD69, CD80, and CD86 (**Figure 1C**). IhM $\phi$  however contained almost exclusively a population of CD49a<sup>+</sup> cells, which was very rare in pbMOs (**Figure 1C**), similarly to what has been described for intrahepatic NK cells (11, 14). No differences in the expression of the studied markers were observed between CD14<sup>lo</sup>CD16<sup>hi</sup>, CD14<sup>int-hi</sup>CD16<sup>int</sup>, and CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>lo</sup> monocytes/M $\phi$  (data not shown). We subsequently gated on CD49a<sup>+</sup> and CD49a<sup>-</sup> ihM $\phi$  and compared the proportion of cells expressing activation markers. Compared to CD49a<sup>-</sup> ihM $\phi$ , CD49a<sup>+</sup> ihM $\phi$  contained higher proportion of cells expressing CD69, CD80, CD83, and CD86 (**Figure 1D**). Taken together, the data demonstrate that CD49a, but not CD69, can serve as a marker to identify intrahepatic M $\phi$ , and that CD49a<sup>+</sup> ihM $\phi$  represent the main M $\phi$  population in livers expressing molecules of cellular activation.





**FIGURE 1 |** Immunophenotyping of macrophages (Mφ) and monocytes (MOs) in leukocytes from liver (IHLs) and blood (PBMCs). **(A)** Comparison of cell subset distribution between intrahepatic leukocytes (IHLs) (dark red) and matched peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (white) ( $n = 14$ ). **(B)** t-SNE analysis of one representative sample showing the expression of CD49a, CD83, CD86, CD32, CD80, CD11c, and CD69 in both PBMCs and IHLs. **(C)** Scatter plots showing the frequency of CD49a<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>, CD80<sup>+</sup>, CD83<sup>+</sup>, and CD86<sup>+</sup> cells on Mφ on IHLs (dark red) and MOs on PBMCs (white). **(D)** Scatter plots showing the frequency of CD69<sup>+</sup>, CD80<sup>+</sup>, CD83<sup>+</sup>, and CD86<sup>+</sup> cells on CD49a<sup>+</sup> ihMφ (red) and CD49a<sup>-</sup> ihMφ (salmon). Median with min-max range is shown ( $n = 14$ ). All samples were analyzed using Mann-Whitney test and were additionally corrected for test-multiplicity using the original FDR method of Benjamini and Hochberg. Only statistically significant  $p$ -values are shown.

### CD49a, VSIG4, and MARCO Serve as Markers for Intrahepatic Mφ

To further characterize CD49a<sup>+</sup> ihMφ in livers, CD68, VSIG4, and MARCO, three markers recently described to help define monocyte and macrophages in tissues (18, 23, 33), were used to stain CD49<sup>+</sup> ihMφ by immunofluorescence of frozen acetone-fixed liver tissue slides. The staining confirmed that CD49a, MARCO and VSIG4 were expressed in liver tissues, as previously described in mice or humans (11, 14, 20, 23, 27), including on hepatocytes (Figure 2A, Supplementary Figures 3A,B). Liver

tissues furthermore contained a high number of CD68<sup>+</sup> cells, indicating high numbers of monocytes/Mφ (Figure 2A, Supplementary Figure 3). Specifically, our results showed that VSIG4<sup>+</sup> Mφ in liver tissues, defined as positive for CD68, can also co-express CD49a and MARCO (Figures 2A,B). Boolean gating on the measured CD49a, VSIG4, and MARCO on CD68<sup>+</sup> signals showed distinct populations of intrahepatic macrophages expressing different combinations of the three markers (Figure 2B). The three most prominent populations were either co-expressing all three markers, co-expressing VSIG4



and MARCO or none of the markers (**Figure 2B**). The presence of CD68<sup>+</sup> signals only co-expressing MARCO and CD49a was scarce. Signal intensities of CD49a and VSIG4, as well as VSIG4 and MARCO, significantly correlated, indicating a strong co-expression pattern, while signal intensities of CD49a and MARCO did not correlate (**Figure 2C**). Furthermore, a binary analysis assessing the signal intensity of the three investigated markers (CD49a, MARCO and VSIG4) on populations either positive or negative for one of the other markers showed higher intensity for the respective markers on positive cells, with for example significantly higher CD49a intensity on VSIG4<sup>+</sup> signals compared to VSIG4<sup>-</sup> signals (**Figure 2D**). The only exception was CD49a intensity on MARCO<sup>+/-</sup> signals (**Figure 2D**). Taken together, these data show the expression of CD49a, MARCO and VSIG4 on liver-derived M $\phi$  populations, and identified M $\phi$  populations expressing different combination of these markers.

To confirm the immunofluorescence results, we subsequently stained matched unstimulated freshly-derived liver and PBMCs samples directly *ex vivo* for VSIG4, CD49a, and MARCO, and quantified marker expression using flow cytometry. CD49a<sup>+</sup> ihM $\phi$  showed significantly higher median fluorescence intensities (MdfIs) of VSIG4- and also MARCO-expression compared to CD49a<sup>-</sup> ihM $\phi$  or PBMCs (**Figures 3A,B**). CD49a and MARCO MdfIs were furthermore significantly higher on VSIG4<sup>+</sup> ihM $\phi$  compared to VSIG4<sup>-</sup> ihM $\phi$  (**Figures 3C,D**), and VSIG4 and CD49a MdfIs were higher on MARCO<sup>+</sup> cells compared to MARCO<sup>-</sup> cells (**Figures 3E,F**). These data acquired using multiparameter flow cytometry therefore largely mirrored data acquired by immunofluorescence analysis of liver samples. Overall, the data obtained with the two different techniques showed that CD49a, MARCO, and/or VSIG4 can be used as markers to identify intrahepatic M $\phi$ .

## ihM $\phi$ Have a Higher Baseline Activation Status Compared to pbMOs

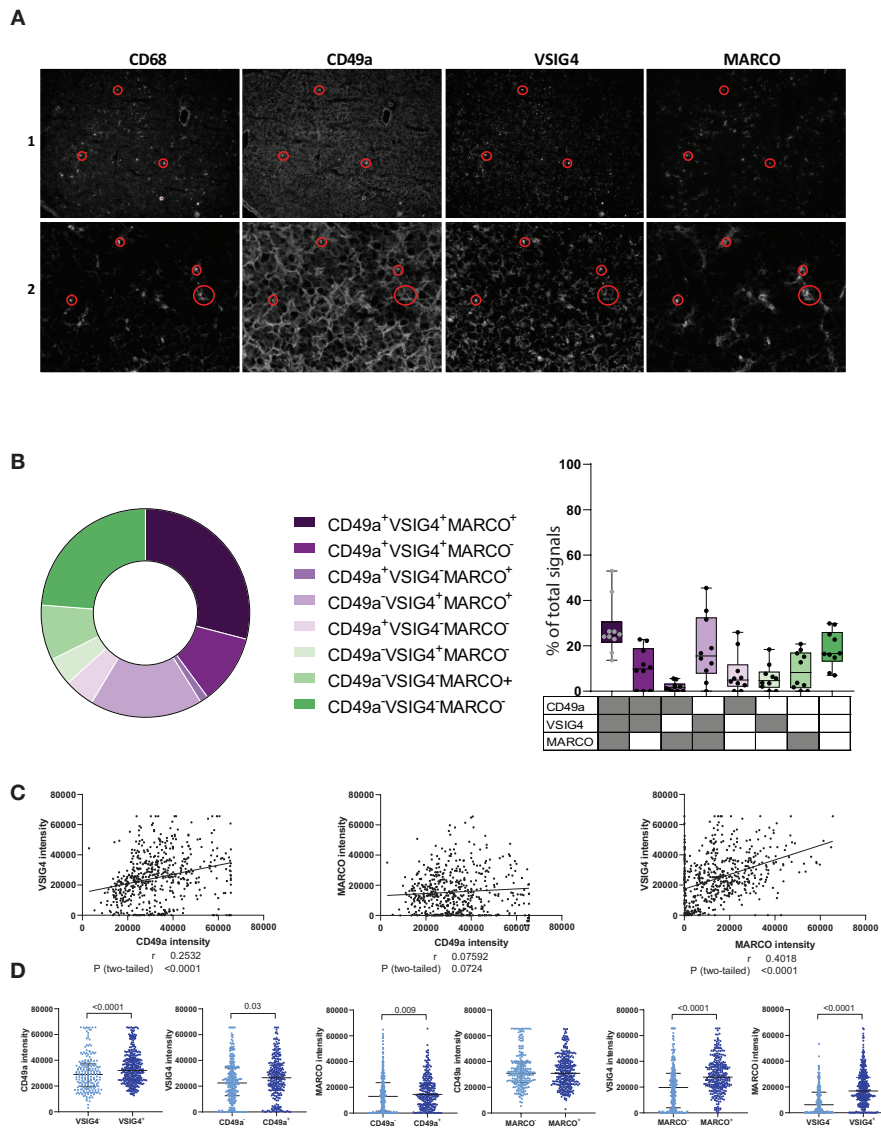
To study the functional activity of ihM $\phi$ , we subsequently stimulated isolated IHLs and PBMCs with LPS (TLR4 stimulation) or CL097 (TLR7/8 stimulation), and used unstimulated cells to control for baseline activation. The proportion of cells expressing TNF- $\alpha$  and IL-12, pro-inflammatory cytokines secreted by MOs and M $\phi$ , as well as IL-10, an anti-inflammatory cytokine, were quantified using flow cytometry. Compared to unstimulated cells, LPS- and CL097-stimulations significantly increased the proportion of TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>, IL-12<sup>+</sup>, and IL-10<sup>+</sup> cells (**Figure 4A**, left panels). IhM $\phi$  responded to LPS and CL097 stimulation by increasing the proportion of TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> and IL-12<sup>+</sup> cells when compared to unstimulated cells (**Figure 4A**, left panel). No or little increase in IL-10<sup>+</sup> ihM $\phi$  was observed after stimulation with LPS compared to baseline levels (**Figure 4A**, lower left panel). When comparing pbMOs and ihM $\phi$ , ihM $\phi$  included a significantly higher proportion of TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>, IL-12<sup>+</sup> and IL-10<sup>+</sup> cells already at baseline, prior to stimulation (**Figure 4A**, right panel). CL097- and LPS-stimulations increased the proportion of TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> cells similarly in pbMOs and ihM $\phi$  (**Figure 4A**, right panel), and LPS-stimulation also increased the proportion of IL-12<sup>+</sup>

and IL-10<sup>+</sup> ihM $\phi$  when compared to pbMOs (**Figure 4A**, right panel). Altogether, our data showed that ihM $\phi$  have a higher baseline production of cytokines, but are less reactive to further stimulation compared to pbMOs.

We subsequently compared cytokine production between CD49a<sup>+</sup> and CD49a<sup>-</sup> ihM $\phi$ . Upon stimulation, CD49a<sup>-</sup> ihM $\phi$  significantly increased the proportion of TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>, IL-12<sup>+</sup>, and IL-10<sup>+</sup> cells (the latter only with LPS stimulation) while the proportion of cytokine-positive cells was maintained at high levels within the CD49a<sup>+</sup> ihM $\phi$  population (**Figure 4B**, left panel). CD49a<sup>+</sup> ihM $\phi$  represented the main M $\phi$  population in livers already producing TNF- $\alpha$ , IL-12, and IL-10 at baseline without TLR-stimulation, and levels of cytokine production upon stimulation with LPS and CL097 were generally higher in CD49a<sup>+</sup> ihM $\phi$  compared to CD49a<sup>-</sup> ihM $\phi$  (**Figure 4B**, right panels). Finally, we assessed the polyfunctionality of all analyzed cell subsets based on IL-10, IL-12, and TNF- $\alpha$  production, including pbMOs, ihM $\phi$  and CD49a<sup>+/-</sup> ihM $\phi$  using Boolean gating. Cells were stratified into 4 subsets depending on the number of cytokines produced (0–3). The number of cells producing one or more cytokines increased for all populations following stimulation with TLR ligands (**Figure 5A**). Following stimulation with LPS, ihM $\phi$  and in particular CD49a<sup>+</sup> ihM $\phi$  included polyfunctional cells that produced 2 or more cytokines, while similar fractions of 2 or more cytokine-producing cells were observed across all cell subsets following CL097-stimulation (**Figure 5A**). A detailed analysis revealed that TNF- $\alpha$  was the main cytokine produced by unstimulated CD49a<sup>+</sup> ihM $\phi$ , alone or in combination with IL-10 (**Figure 5B**). Upon LPS-stimulation, pbMOs and CD49a<sup>-</sup> ihM $\phi$  had a similar cytokine pattern, while CD49a<sup>+</sup> ihM $\phi$  contained higher proportion of TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup> cells (**Figure 5B**). In summary, CD49<sup>+</sup> ihM $\phi$  exhibited higher baseline cytokine production compared to CD49a<sup>-</sup> ihM $\phi$  cells, resulting in relatively smaller increases in cytokine production in response to further *in vitro* LPS or CL097 stimulations than observed for CD49a<sup>-</sup> ihM $\phi$  or pbMOs.

## DISCUSSION

The liver plays a central role in regulating immune responses and inflammation. Antigen-presenting cells in the liver, such as intrahepatic M $\phi$ , sense and recognize pathogen-associated and danger-associated molecular patterns through pattern recognition receptors (PRRs) (34). The localization of intrahepatic M $\phi$  within the liver sinusoids in close proximity to LSECs has been suggested to be essential for the functionality of intrahepatic M $\phi$ . During acute or chronic liver diseases, intrahepatic M $\phi$  have been described to control liver injury by shaping an anti-inflammatory liver immune response (35). However, due to limited availability of human liver samples, very little is known about the phenotype and function of human liver M $\phi$ . Here we show that intrahepatic M $\phi$  can be identified based on the expression of the integrin  $\alpha$ 1 receptor CD49a, similar to intrahepatic NK cells (11, 14), the complement component 3 receptor VSIG4 and MARCO. Our results furthermore demonstrate that liver-derived CD49a<sup>+</sup> ihM $\phi$  cells exhibit

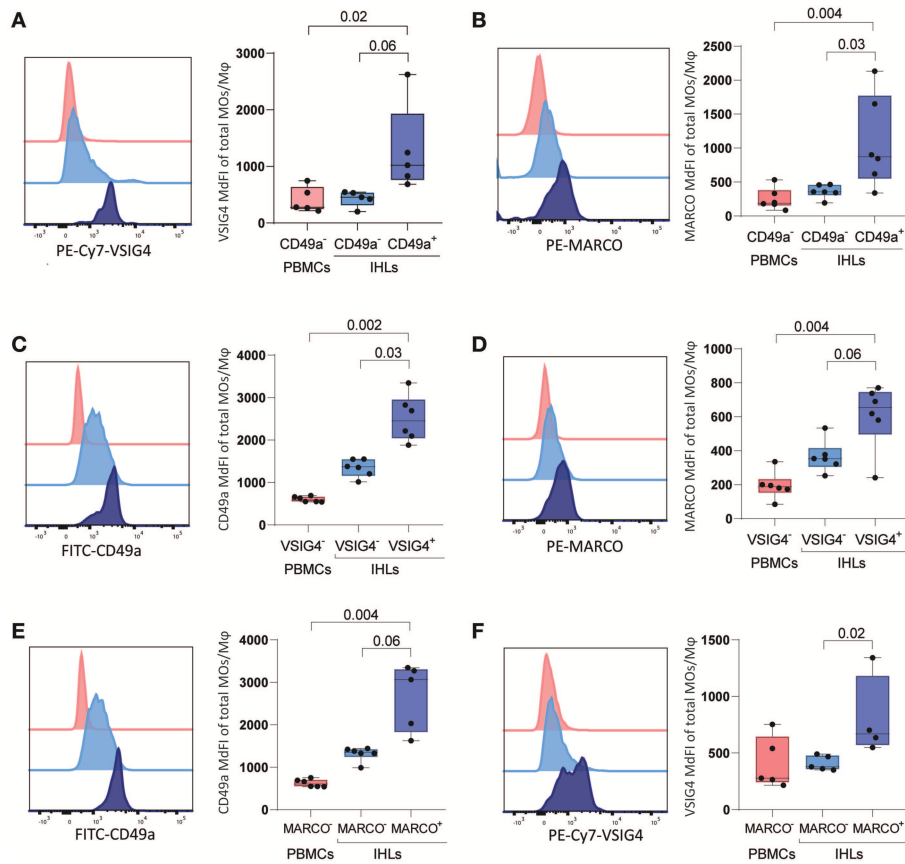


**FIGURE 2 |** Immunofluorescence data showing CD49a, VSIG4 and MARCO expression in human intrahepatic macrophages. **(A)** Representative immunofluorescence staining of CD68, CD49a, VSIG4, and MARCO in frozen and acetone-fixed liver tissue sections in two liver samples. The red circles depict examples of co-expression of the four markers. **(B)** Boolean gating on masked CD68<sup>+</sup> signals defining CD49a, VSIG4 and MARCO signal combinations ( $n = 561$  signals from 10 tissue slides). **(C)** Correlation plots between CD49a and VSIG4 signal intensity (left), CD49a and MARCO (middle) and MARCO and VSIG4 (right) in cells defined as CD68<sup>+</sup> ( $n = 561$  pairs). **(D)** Scatter plots showing signal intensities of CD49a, MARCO and VSIG4 on CD68<sup>+</sup> cells, categorized by VSIG4<sup>+/-</sup> ( $n = 209$  for VSIG4<sup>-</sup> and  $n = 352$  for VSIG4<sup>+</sup>), CD49a<sup>+/-</sup> ( $n = 291$  for CD49a<sup>-</sup> and  $n = 270$  for CD49a<sup>+</sup>), and MARCO<sup>+/-</sup> signals ( $n = 247$  for MARCO<sup>-</sup> and  $n = 314$  for MARCO<sup>+</sup>). Negative signals for each marker are represented in light blue and positive signals in dark blue. Median is depicted and error bars indicate the interquartile range,  $p$ -value determined by Mann-Whitney test.

an increased baseline production of cytokines and higher expression of maturation and activation markers compared to CD49a<sup>-</sup> ihMφ.

Monocytes and Mφ can be sub-classified depending on the expression of cell surface markers into classical CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>lo</sup>, intermediate CD14<sup>int-hi</sup>CD16<sup>int</sup> and non-classical CD14<sup>lo</sup>CD16<sup>hi</sup> cells, each exhibiting different functions (9). The CD14<sup>lo</sup>CD16<sup>hi</sup> monocytes and Mφ subset has been associated with inflammatory responses including immune activation and antigen presentation, while CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>lo</sup> and

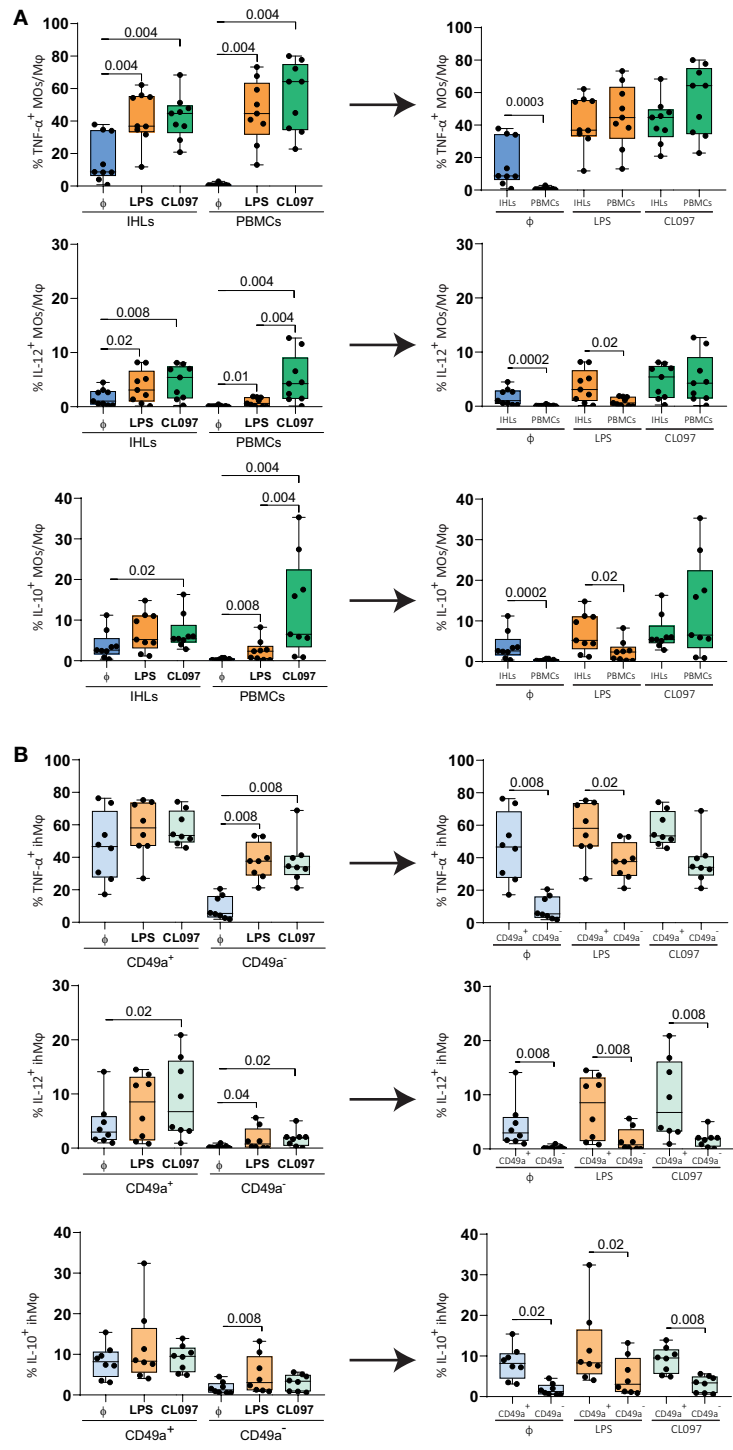
CD14<sup>int-hi</sup>CD16<sup>int</sup> monocytes and Mφ subsets preferentially exert phagocytic functions (36). Comparing peripheral blood- and liver-derived Mφ from the same study subjects, we observed that the proportion of CD14<sup>int-hi</sup>CD16<sup>int</sup> cells in ihMφ was higher than in matched pbMOs. In contrast, CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>lo</sup> monocytes and Mφ subsets were present in a lower proportion within ihMφ when compared to pbMOs, confirming previous studies (10). CD14<sup>int-hi</sup>CD16<sup>int</sup> monocytes have been suggested to possess inflammatory functions, as they are often expanded in inflammatory disorders (37). Expansion



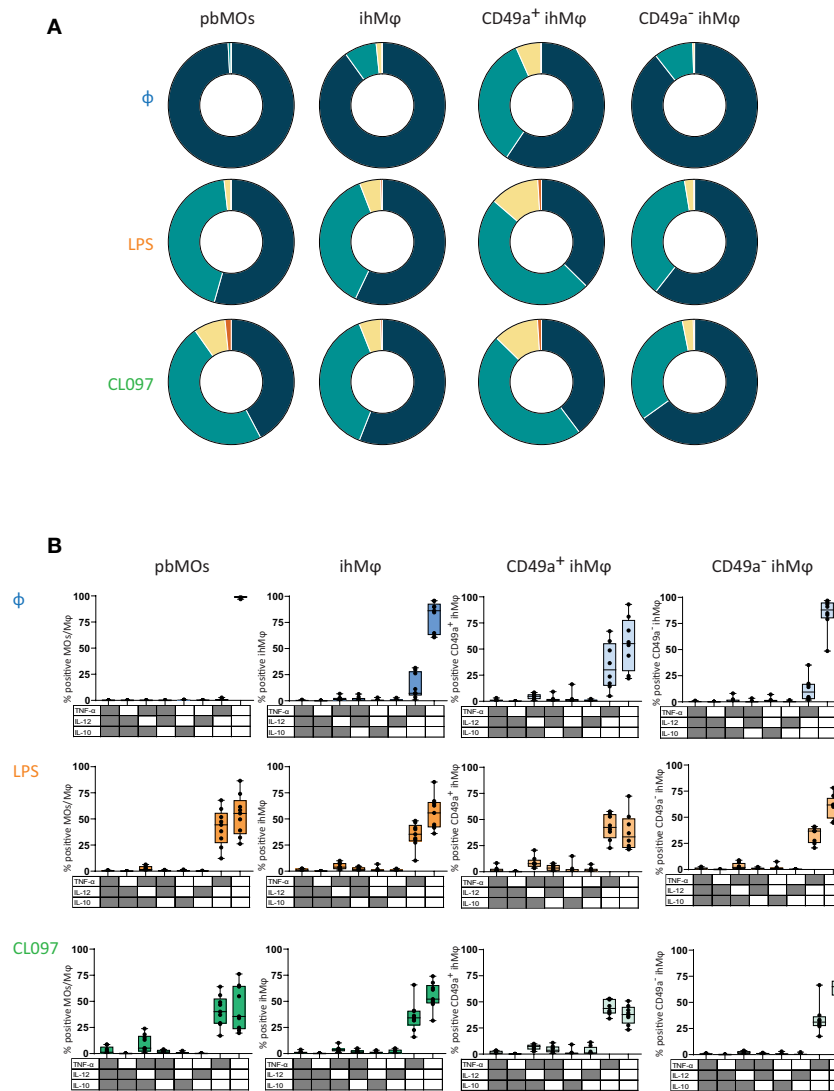
**FIGURE 3 |** Expression of VSIG4, MARCO and CD49a on freshly isolated PBMCs and IHLs **(A)** (left) Representative histogram of VSIG4 expression on gated CD49a<sup>-</sup> PBMCs (red), CD49a<sup>-</sup> ihMφ (light blue), and CD49a<sup>+</sup> ihMφ (dark blue). (right) Scatter plot summarizing VSIG4 MdFI on CD49a<sup>-</sup> PBMCs (red), CD49a<sup>-</sup> ihMφ (light blue) and CD49a<sup>+</sup> ihMφ (dark blue) (*n* = 5). **(B)** (left) Representative histogram of MARCO expression on gated CD49a<sup>-</sup> PBMCs (red), CD49a<sup>-</sup> ihMφ (light blue) and CD49a<sup>+</sup> ihMφ (dark blue). (right) Scatter plot summarizing MARCO MdFI on CD49a<sup>-</sup> PBMCs (red), CD49a<sup>-</sup> ihMφ (light blue) and CD49a<sup>+</sup> ihMφ (dark blue) (*n* = 6). **(C)** (left) Representative histogram of CD49a expression on gated VSIG4<sup>-</sup> PBMCs (red), VSIG4<sup>-</sup> ihMφ (light blue) and VSIG4<sup>+</sup> ihMφ (dark blue). (right) Scatter plot summarizing CD49a MdFI on VSIG4<sup>-</sup> PBMCs (red), VSIG4<sup>-</sup> ihMφ (light blue) and VSIG4<sup>+</sup> ihMφ (dark blue) (*n* = 6). **(D)** (left) Representative histogram of MARCO expression on gated VSIG4<sup>-</sup> PBMCs (red), VSIG4<sup>-</sup> ihMφ (light blue) and VSIG4<sup>+</sup> ihMφ (dark blue). (right) Scatter plot summarizing MARCO MdFI on VSIG4<sup>-</sup> PBMCs (red), VSIG4<sup>-</sup> ihMφ (light blue) and VSIG4<sup>+</sup> ihMφ (dark blue) (*n* = 6). **(E)** (left) Representative histogram of CD49a expression on gated MARCO<sup>-</sup> PBMCs (red), MARCO<sup>-</sup> ihMφ (light blue) and MARCO<sup>+</sup> ihMφ (dark blue). (right) Scatter plot summarizing CD49a MdFI on MARCO<sup>-</sup> PBMCs (red), MARCO<sup>-</sup> ihMφ (light blue) and MARCO<sup>+</sup> ihMφ (dark blue) (*n* = 6 for PBMCs and MARCO<sup>-</sup> IHLs, *n* = 5 for MARCO<sup>+</sup> IHLs). **(F)** (left) Representative histogram of VSIG4 expression on gated MARCO<sup>-</sup> PBMCs (red), MARCO<sup>-</sup> ihMφ (light blue) and MARCO<sup>+</sup> ihMφ (dark blue). (right) Scatter plot summarizing VSIG4 MdFI on MARCO<sup>-</sup> PBMCs (red), MARCO<sup>-</sup> ihMφ (light blue) and MARCO<sup>+</sup> ihMφ (dark blue) (*n* = 5 for PBMCs and MARCO<sup>-</sup> IHLs, *n* = 4 for MARCO<sup>+</sup> IHLs). One sample was excluded due to the low proportion of MARCO<sup>+</sup> cells. Median is depicted and error bars indicate the min-max range, *p*-value determined by Mann-Whitney test (PBMCs vs. IHLs) and Wilcoxon matched-pairs signed rank test when comparing IHL populations.

of CD14<sup>int-hi</sup>CD16<sup>int</sup> ihMφ during fibrosis/cirrhosis has been demonstrated, indicating that this cell subset contributes to intrahepatic inflammation via its proinflammatory cytokine profile (38). As the spectrum of liver diseases in our study cohort was heterogeneous, ranging from alcoholic liver disease to HCV infection, and the size of the study cohort was small, it was not possible to determine differences between liver- and peripheral blood-derived monocytes and Mφ subsets in the context of the underlying liver diseases. Taken together, our data suggest that livers contained a higher proportion of developing transitional Mφ, which might be due to a high level of inflammation in the liver samples included in this study.

Contrary to mouse liver-derived Mφ (mouse KCs) that can be distinguished from circulating monocytes by expression of F4/80 glycoprotein, a member of the EGF-TM7 receptor family (39, 40), markers clearly distinguishing human liver-derived macrophages from monocytes are lacking. CD68 has been suggested as a possible marker for human KCs, although it is not-exclusive (41). Recently, the V-set and Ig domain-containing 4 (VSIG4), also known as CRIG, has been suggested to identify mice and human macrophages in tissues, as it is largely absent on circulating monocytes (17, 18, 22–24, 42). VSIG4 has several roles in immune regulation serving as an immunosuppressive and anti-inflammatory molecule, and was also described to efficiently phagocytose bacteria and



**FIGURE 4 |** Functional responses of paired ihMφ and pbMφ to CL097 and LPS stimulations compared to unstimulated cells. **(A)** Scatter plots showing the comparison of the frequencies of TNF- $\alpha^+$  cells (top), IL-12 $^+$  cells (middle) and IL-10 $^+$  cells (bottom) between pbMφ and ihMφ stimulated with LPS (orange) or CL097 (green), to unstimulated cells (blue) ( $n = 9$ ). **(B)** Comparison of the frequency of TNF- $\alpha^+$  ihMφ (top) IL-12 $^+$  ihMφ (middle) and IL-10 $^+$  (bottom) cells between CD49a $^+$  and CD49a $^-$  ihMφ once stimulated with LPS (light orange) or CL097 (light green), to unstimulated cells (light blue) ( $n = 8$ ). Medians and min-max range are showed. Liver and PBMCs comparisons were analyzed with a Mann–Whitney test and corrected for test-multiplicity using the original FDR method of Benjamini and Hochberg. Data in **(B)** was analyzed using a Wilcoxon matched-pairs signed rank test when comparing IHL populations. The arrows represent the reorganization of the same data. One sample was excluded from B due to the low amount of cells within the CD49a $^+$  ihMφ gating.  $\phi$ : unstimulated. Only statistically significant  $p$ -values are shown.



**FIGURE 5 |** Polyfunction on cytokine responses of paired ihMφ and pbMOs. **(A)** Pie chart summarizing the percentage of MOs/Mφ expressing 0, 1, 2, or 3 cytokines, without stimulation or following LPS- or CL097-stimulation (blue: 0; green: 1; yellow: 2; orange: 3) ( $n = 9$  for pbMOs and ihMφ,  $n = 8$  for CD49a<sup>+</sup> ihMφ and CD49a<sup>-</sup> ihMφ). **(B)** Boolean gating of cells expressing TNF-α, IL-12, and/or IL-10 on LPS-(orange), CL097-(green)stimulated pbMOs, ihMφ, CD49a<sup>+</sup> ihMφ, and CD49a<sup>-</sup> ihMφ. Unstimulated (blue) condition was used to calculate the baseline production of cytokines. One sample was excluded from the ihMφ analysis due to the low amount of cells within the CD49a<sup>+</sup> gating Medians and min-max range are showed.

boost elimination of intracellular microorganisms (22, 43). A recent publication furthermore suggested the presence of two differentiated monocyte/Mφ subsets in human liver samples, dependent on the expression of the PRR MARCO on the cell surface (23). Previous studies have also shown that the expression of CD49a identifies a population of tissue-resident NK and T cells in mice and humans (11–14, 27, 44–46). CD49a is the α1 subunit of α1β1 integrin, a receptor associated with adhesion of lymphocytes to collagen IV. In line with these observations for NK and T cells, we detected CD49a-expression exclusively on liver-derived Mφ, while CD49a<sup>+</sup> MOs

were largely absent in peripheral blood. Within ihMφ, the expression of CD69, CD80, CD83, and CD86 was higher on CD49a<sup>+</sup> Mφ compared to CD49a<sup>-</sup> Mφ. Our data using both flow cytometry and immunofluorescence staining of liver tissue samples furthermore showed that ihMφ consisted of a variety of subpopulations expressing different combinations of CD49a, VSIG4 and MARCO.

The liver has been traditionally described as a tolerogenic organ, with Kupffer cells (KCs) and dendritic cells representing the main cell subsets mediating tolerance. KCs suppress CD8<sup>+</sup> T cell activity by several mechanisms, including overexpression



of Fas-Ligand, which induces CD8<sup>+</sup> T cell destruction (47); overexpression of PD-L1, which leads to cell exhaustion through PD-1 receptor on T cells (48); or secretion of IL-10, an immunosuppressive cytokine (49, 50). Although intrahepatic KCs have been shown in mice and rats to express TLRs (51, 52), those cells are hypo-responsive to endogenous LPS and also other TLR ligands (53). Nonetheless, novel antigens arising from microbial infections, such as influenza in humans, strongly activate liver macrophages (54). Predisposition for endotoxin-tolerance might be primarily due to an adjustment to PAMPs arising from intestinal microbiota, which are not posing an immunological threat. This effect might be particularly relevant during inflammation, when higher gut translocation of bacterial and viral PAMPs is observed (6). Human macrophages are classified in M1 or M2 according to their functional properties: M1 macrophages are pro-inflammatory, by secreting TNF- $\alpha$  and IL-12, and induce a Th1 and Th17 response, while M2 macrophages, secreting IL-10, have been shown to be anti-inflammatory and recruit a Th2 response (55). Our results are in line with endotoxin-tolerance, as CD49a<sup>+</sup> ihM $\phi$  contained a higher proportion of cells expressing activation markers and higher cytokine levels at baseline, but did not strongly react to further TLR4 or TLR7/8 stimuli. Moreover, the majority of cytokine-producing cells within the CD49a<sup>+</sup> ihM $\phi$  population exhibited an M1 phenotype, as they produced TNF- $\alpha$  and/or IL-12 at baseline. Since the production of IL-12 by monocytes/macrophages upon LPS-exposure was shown to be dependent on previous IFN- $\gamma$ -mediated priming (56), our data indicate that IFN- $\gamma$ -producing cells, such as intrahepatic NK or T cells, might be able to prime CD49a<sup>+</sup> ihM $\phi$ .

In conclusion, we showed in this study that human intrahepatic macrophages can co-express CD49a, VSIG4 and/or MARCO. CD49a<sup>+</sup> ihM $\phi$  had distinct phenotypical patterns as well as functional properties, when compared to CD49a<sup>-</sup> ihM $\phi$  and peripheral blood-derived monocytes.

## ETHICS STATEMENT

This study was carried out in accordance with the recommendations of the Institutional Review Board of the medical faculty at the University of Hamburg (PV4898, PV4081,

PV4780, and WF-021/11) with written informed consent from all subjects. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the Institutional Review Board of the medical faculty at the University of Hamburg.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

GM, HG, SL, and MA: conceived and designed the experiments. GM, HG, AEL, JK, FF, AN, and SL: performed the experiments. GM, HG, AEL, WS, LUH, AEZ, SML, KR, and TP: processed the liver samples. GM, HG, FF, JK, and SL: analyzed the data. GM and SL: performed the statistical analysis. MK, BN, and KJO: provided the clinical samples. CS, MD, and MA: provided resources. GM, SL, and MA: drafted the paper. All authors critically reviewed and approved the final version of the paper.

## FUNDING

This work was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 841), the Helmut and Hannelore Greve Foundation and the YAEL Foundation. HG, LUH, and AEZ were financially supported by the Graduiertenkolleg (GRK SFB841) from the University Medical Center Hamburg-Eppendorf (UKE). AEL and TP were financially supported by the KFO306.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank all donors, cohort organizers, nurses, and doctors at the Department of Hepatobiliary and Transplant Surgery at UKE (University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany) and at the Department of General and Abdominal Surgery (Asklepios Hospital Barmbek, Hamburg, Germany). The publication of this article was funded by the Open Access Fund of the Leibniz Association.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.01247/full#supplementary-material>

## REFERENCES

- Manzella A, Ohtomo K, Monzawa S, Lim JH. Schistosomiasis of the liver. *Abdom Imaging*. (2008) 33:144–50. doi: 10.1007/s00261-007-9329-7
- Crispe IN. Immune tolerance in liver disease. *Hepatology*. (2014) 60:2109–17. doi: 10.1002/hep.27254
- Huang H, Lu Y, Zhou T, Gu G, Xia Q. Innate immune cells in immune tolerance after liver transplantation. *Front Immunol*. (2018) 9:2401. doi: 10.3389/fimmu.2018.02401
- Crispe IN. The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol*. (2009) 27:147–63. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132629
- Gao B, Jeong WI, Tian Z. Liver: an organ with predominant innate immunity. *Hepatology*. (2008) 47:729–36. doi: 10.1002/hep.22034
- Talwani R, Gilliam BL, Howell C. Infectious diseases and the liver. *Clin Liver Dis*. (2011) 15:111–30. doi: 10.1016/j.cld.2010.09.002
- Heymann F, Tacke F. Immunology in the liver—from homeostasis to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. (2016) 13:88–110. doi: 10.1038/nrgastro.2015.200
- Werner M, Driftmann S, Kleinehr K, Kaiser GM, Mathe Z, Treckmann JW, et al. All-in-one: advanced preparation of human parenchymal and non-parenchymal liver cells. *PLoS ONE*. (2015) 10:e0138655. doi: 10.1371/journal.pone.0138655
- Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. (2010) 116:e74–80. doi: 10.1182/blood-2010-02-258558

10. 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
11. Marquardt N, Beziat V, Nystrom S, Hengst J, Ivarsson MA, Kekalainen E, et al. Cutting edge: identification and characterization of human intrahepatic CD49a+ NK cells. *J Immunol*. (2015) 194:2467–71. doi: 10.4049/jimmunol.1402756
12. Peng H, Jiang X, Chen Y, Sojka DK, Wei H, Gao X, Sun R, Yokoyama WM, Tian Z. Liver-resident NK cells confer adaptive immunity in skin-contact inflammation. *J Clin Invest*. (2013) 123:1444–56. doi: 10.1172/JCI66381
13. Cheuk S, Schlums H, Gallais Serezal I, Martini E, Chiang SC, Marquardt N, et al. CD49a expression defines tissue-resident CD8+ T cells poised for cytotoxic function in human skin. *Immunity*. (2017) 46:287–300. doi: 10.1016/j.immuni.2017.01.009
14. Martrus G, Kautz T, Lunemann S, Richert L, Glau L, Salzberger W, et al. Proliferative capacity exhibited by human liver-resident CD49a+CD25+ NK cells. *PLoS ONE*. (2017) 12:e0182532. doi: 10.1371/journal.pone.0182532
15. Langeneckert AE, Lunemann S, Martrus G, Salzberger W, Hess LU, Ziegler AE, et al. CCL21-expression and accumulation of CCR7(+) NK cells in livers of patients with primary sclerosing cholangitis. *Eur J Immunol*. (2019) 49:758–69. doi: 10.1002/EJL.201847965/v2/response1
16. Vogt L, Schmitz N, Kurrer MO, Bauer M, Hinton HI, Behnke S, et al. VSIG4, a B7 family-related protein, is a negative regulator of T cell activation. *J Clin Invest*. (2006) 116:2817–26. doi: 10.1172/JCI25673
17. He JQ, Wiesmann C, van Lookeren Campagne M. A role of macrophage complement receptor CR1g in immune clearance and inflammation. *Mol Immunol*. (2008) 45:4041–7. doi: 10.1016/j.molimm.2008.07.011
18. Liao Y, Guo S, Chen Y, Cao D, Xu H, Yang C, et al. VSIG4 expression on macrophages facilitates lung cancer development. *Lab Invest*. (2014) 94:706–15. doi: 10.1038/labinvest.2014.73
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. Li J, Diao B, Guo S, Huang X, Yang C, Feng Z, et al. VSIG4 inhibits proinflammatory macrophage activation by reprogramming mitochondrial pyruvate metabolism. *Nat Commun*. (2017) 8:1322. doi: 10.1038/s41467-017-01327-4
21. Krenkel O, Tacke F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol*. (2017) 17:306–21. doi: 10.1038/nri.2017.11
22. Irvine KM, Banh X, Gadd VL, Wojcik KK, Ariffin JK, Jose S, et al. CR1g-expressing peritoneal macrophages are associated with disease severity in patients with cirrhosis and ascites. *JCI Insight*. (2016) 1:e86914. doi: 10.1172/jci.insight.86914
23. MacParland SA, Liu JCX, Ma Z, Innes BT, Bartczak AM, Gage BK, et al. Single cell RNA sequencing of human liver reveals distinct intrahepatic macrophage populations. *Nat Commun*. (2018) 9:4383. doi: 10.1038/s41467-018-06318-7
24. Jung K, Kang M, Park C, Hyun Choi Y, Jeon Y, Park SH, et al. Protective role of V-set and immunoglobulin domain-containing 4 expressed on kupffer cells during immune-mediated liver injury by inducing tolerance of liver T- and natural killer T-cells. *Hepatology*. (2012) 56:1838–48. doi: 10.1002/hep.25906
25. Salzberger W, Martrus G, Bachmann K, Goebels H, Hess L, Koch M, et al. Tissue-resident NK cells differ in their expression profile of the nutrient transporters Glut1, CD98 and CD71. *PLoS ONE*. (2018) 13:e0201170. doi: 10.1371/journal.pone.0201170
26. Lunemann S, Schobel A, Kah J, Fittje P, Holzemer A, Langeneckert AE, et al. Interactions between KIR3DS1 and HLA-F activate natural killer cells to control HCV replication in cell culture. *Gastroenterology*. (2018) 155:1366–71.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2018.07.019
27. Lunemann S, Martrus G, Goebels H, Kautz T, Langeneckert A, Salzberger W, et al. Hobit expression by a subset of human liver-resident CD56bright natural killer cells. *Sci Rep*. (2017) 7:6676. doi: 10.1038/s41598-017-06011-7
28. Taghizadeh RR, Cetrulo KJ, Cetrulo CL. Collagenase impacts the quantity and quality of native mesenchymal stem/stromal cells derived during processing of umbilical cord tissue. *Cell Transplant*. (2018) 27:181–93. doi: 10.1177/0963689717744787
29. Scully EP, Lockhart A, Garcia-Beltran W, Palmer CD, Musante C, Rosenberg E, et al. Innate immune reconstitution with suppression of HIV-1. *JCI Insight*. (2016) 1:e85433. doi: 10.1172/jci.insight.85433
30. Testi R, Cifone MG, Santoni A. Role of CD69 in NO production by human monocytes. *Res Immunol*. (1995) 146:682–3. doi: 10.1016/0923-2494(96)84917-0
31. Cao W, Lee SH, Lu J. CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. *Biochem J*. (2005) 385:85–93. doi: 10.1042/BJ20040741
32. Fleischer J, Soeth E, Reiling N, Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. Differential expression and function of CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) on human peripheral blood monocytes. *Immunology*. (1996) 89:592–8. doi: 10.1046/j.1365-2567.1996.d01-785.x
33. Gordon S, Pluddemann A, Martinez Estrada F. Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunol Rev*. (2014) 262:36–55. doi: 10.1111/imr.12223
34. Mencin A, Kluge J, Schwabe RF. Toll-like receptors as targets in chronic liver diseases. *Gut*. (2009) 58:704–20. doi: 10.1136/gut.2008.156307
35. Horst AK, Neumann K, Diehl L, Tiegs G. Modulation of liver tolerance by conventional and nonconventional antigen-presenting cells and regulatory immune cells. *Cell Mol Immunol*. (2016) 13:277–92. doi: 10.1038/cmi.2015.112
36. Mukherjee R, Kanti Barman P, Kumar Thatoi P, Tripathy R, Kumar Das B, Ravindran B. Non-classical monocytes display inflammatory features: validation in sepsis and systemic lupus erythematosus. *Sci Rep*. (2015) 5:13886. doi: 10.1038/srep13886
37. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*. (2007) 81:584–92. doi: 10.1189/jlb.0806510
38. Zimmermann HW, Seidler S, Nattermann J, Gassler N, Hellerbrand C, Zerneck 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
39. Mass E, Ballesteros I, Farlik M, Halbritter F, Gunther P, Crozet L, et al. Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis. *Science*. (2016) 353:aaf4238. doi: 10.1126/science.aaf4238
40. Scott CL, Zheng F, De Baetselier P, Martens L, Saey Y, De Prijck S, et al. Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. *Nat Commun*. (2016) 7:10321. doi: 10.1038/ncomms10321
41. Antoniadis CG, Quaglia A, Taams LS, Mitry RR, Hussain M, Abeles R, et al. Source and characterization of hepatic macrophages in acetaminophen-induced acute liver failure in humans. *Hepatology*. (2012) 56:735–46. doi: 10.1002/hep.25657
42. Helmy KY, Katschke KJ, Jr., Gorgani NN, Kljavin NM, Elliott JM, et al. CR1g: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell*. (2006) 124:915–27. doi: 10.1016/j.cell.2005.12.039
43. Kim KH, Choi BK, Song KM, Cha KW, Kim YH, Lee H, et al. CR1g signals induce anti-intracellular bacterial phagosome activity in a chloride intracellular channel 3-dependent manner. *Eur J Immunol*. (2013) 43:667–78. doi: 10.1002/eji.201242997
44. Zhang LH, Shin JH, Haggadone MD, Sunwoo JB. The aryl hydrocarbon receptor is required for the maintenance of liver-resident natural killer cells. *J Exp Med*. (2016) 213:2249. doi: 10.1084/jem.20151998
45. Nizard M, Roussel H, Diniz MO, Karaki S, Tran T, Voron T, et al. Induction of resident memory T cells enhances the efficacy of cancer vaccine. *Nat Commun*. (2017) 8:15221. doi: 10.1038/ncomms15221
46. Mackay LK, Rahimpour A, Ma JZ, Collins N, Stock AT, Hafon ML, et al. The developmental pathway for CD103(+)CD8+ tissue-resident memory T cells of skin. *Nat Immunol*. (2013) 14:1294–301. doi: 10.1038/ni.2744
47. Sun Z, Wada T, Maemura K, Uchikura K, Hoshino S, Diehl AM, et al. Hepatic allograft-derived Kupffer cells regulate T cell response in rats. *Liver Transpl*. (2003) 9:489–97. doi: 10.1053/jlts.2003.50091
48. Wu K, Kryczek I, Chen L, Zou W, Welling TH. Kupffer cell suppression of CD8+ T cells in human hepatocellular carcinoma is mediated by B7-H1/programmed death-1 interactions. *Cancer Res*. (2009) 69:8067–75. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0901



49. Yuan F, Zhang W, Mu D, Gong J. Kupffer cells in immune activation and tolerance toward HBV/HCV infection. *Adv Clin Exp Med.* (2017) 26:739–45. doi: 10.17219/acem/62759
50. Erhardt A, Biburger M, Papadopoulos T, Tiegs G. IL-10, regulatory T cells, and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver injury in mice. *Hepatology.* (2007) 45:475–85. doi: 10.1002/hep.21498
51. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity.* (2011) 34:637–50. doi: 10.1016/j.immuni.2011.05.006
52. Nakamoto N, Kanai T. Role of toll-like receptors in immune activation and tolerance in the liver. *Front Immunol.* (2014) 5:221. doi: 10.3389/fimmu.2014.00221
53. Thomson AW, Knolle PA. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat Rev Immunol.* (2010) 10:753–66. doi: 10.1038/nri2858
54. 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; quiz 1404–5. doi: 10.2353/ajpath.2006.050875
55. Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Front Immunol.* (2014) 5:514. doi: 10.3389/fimmu.2014.00514
56. Dobashi K, Aihara M, Araki T, Shimizu Y, Utsugi M, Iizuka K, et al. Regulation of LPS induced IL-12 production by IFN-gamma and IL-4 through intracellular glutathione status in human alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol.* (2001) 124:290–6. doi: 10.1046/j.1365-2249.2001.01535.x

**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.

Copyright © 2019 Martrus, Goebels, Langeneckert, Kah, Flomm, Ziegler, Niehrs, Löbl, Russu, Hess, Salzberger, Poch, Nshan, Schramm, Oldhafer, Dandri, Koch, Lunemann and Altfeld. 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) and the copyright owner(s) 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.

## 2. Zusammenfassung der Publikation

### 2.1. Einleitung

Die Leber ist nicht nur ein integraler Bestandteil des menschlichen Stoffwechsels und ein zentrales Entgiftungsorgan, sondern auch maßgeblich an der unspezifischen Immunabwehr beteiligt. Darüber hinaus nimmt das Organ mit seinen lebereigenen Makrophagen, auch bekannt als Kupffer-Zellen, an der Immunabwehr teil (Dey et al. 2014). Die Kupffer-Zellen gehören zu den antigenpräsentierenden Zellen (APCs) und bilden eine der größten relevanten Subpopulationen der humanen Immunzellen (Crispe 2009). Neben der Fähigkeit zur Antigenpräsentation tragen die Kupffer-Zellen durch ihre Phagozytose-Fähigkeit als Teil des mononukleär-phagozytären Systems (MPS) zur Immunabwehr bei. Als Teil des Komplementsystems ermöglichen Kupffer-Zellen außerdem die Elimination zellulärer Abbauprodukte und fördern damit die regenerative Kapazität des Leberparenchyms. Aufgrund ihrer Beheimatung in den Lebersinusoiden und der räumlichen Nähe zum portalen Kreislauf und zum Disse'schen Raum sind die hepatischen Immunzellen außerdem in der Lage, die direkte Abwehr von Pathogenen aus dem venösen gastrointestinalen Stromgebiet zu unterstützen (Zigmond et al., 2014). Die bisher bekannten Untersuchungen thematisieren vorwiegend Monozyten und Makrophagen aus Mausmodellen oder aus peripheren humanen Blutproben (Tacke & Zimmermann, 2014). Daten zu *ex vivo* gewonnenen, humanen Lebergewebsproben sind in ihrer Anzahl jedoch übersichtlich. Das Ziel dieser Dissertation war es, die drei Subpopulationen humaner leberspezifischer Monozyten/Makrophagen – klassische, nicht-klassische und intermediäre Monozyten – auf Grundlage der für leberresidente Zellen bekannten Marker CD49a, VSIG4 und MARCO funktionell und phänotypisch zu charakterisieren. Hierzu wurden assoziierte Proben aus Blut und Lebergewebe immunologisch untersucht und hinsichtlich ihrer Menge und Aktivität miteinander verglichen.

Humane Monozyten aus dem Blut lassen sich anhand bestimmter, als Cluster of Differentiation (CD) definierte Oberflächenmarker in drei Subpopulationen untergliedern: klassische Monozyten mit hoher Ausprägung von CD14 und geringer Ausprägung von CD16 (CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>lo</sup>), nicht-klassische Monozyten mit geringer CD14 und hoher CD16 Ausprägung (CD14<sup>lo</sup>CD16<sup>hi</sup>), sowie intermediäre Monozyten, bei denen CD16 hoch und CD14 mäßig bis hoch ausgeprägt ist (CD14<sup>int-hi</sup>CD16<sup>int</sup>) (Italiani & Boraschi, 2014). Funktionell handelt es sich bei den nicht-klassischen Monozyten um antigenpräsentierende, pro-inflammatorische Zellen der angeborenen Immunabwehr, welche primär das Interleukin 12 (IL-12) produzieren. Derweil gelten die klassischen und intermediären Monozyten als vorwiegend immunregulatorische

Zellen, welche über das von ihnen produzierte Interleukin 10 (IL-10) maßgeblich an der Pathogenphagozytose beteiligt sind (Mukherjee et al., 2015).

CD49a (Integrin  $\alpha 1$ ) ist ein  $\alpha 1$ -Zelladhäsionsmolekül, welches als Marker für leberresidente NK-Zellen (Natürliche Killerzellen) in Mäusen und humanen Proben spezifiziert wurde und im Zusammenspiel mit Integrin  $\beta 1$  einen heterodimeren Rezeptor für Laminin und Kollagen IV bildet (Manzella et al. 2008). VSIG4 (V-set and immunoglobulin domain containing 4) ist ein Protein, welches eine Immunglobulin-Domäne enthält. Es ist immunregulatorisch über den Systemkomplex 3 (C3b und iC3b) ebenfalls am Komplementsystem beteiligt und wurde als Marker für lebereigene Kupffer-Zellen in Mäusen beschrieben (Liao et al., 2014). Es wird angenommen, dass dieser Marker auch bei humanen hepatischen und peritonealen Gewebeproben eine Rolle spielen könnte (Vogt et al., 2006). MARCO (macrophage receptor with collagenous structure) gehört zu den Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRR) und konnte gemeinsam mit VSIG4 mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierung als humaner Marker für leberresidente Makrophagen identifiziert werden (MacParland et al., 2018).

Neben der Phänotypisierung der einzelnen Subpopulationen leberresidentialer Makrophagen konnte in unseren Untersuchungen über die Expression der Entzündungsmarker IL-12 und IL-10 sowie des Tumornekrosefaktors TNF- $\alpha$  eine erhöhte Aktivität in der Population der CD49a<sup>+</sup> Makrophagen beobachtet werden.

## **2.2. Material und Methoden**

Im Rahmen einer prospektiven Querschnittstudie mit insgesamt 33 Patientinnen und Patienten wurde zunächst eine Vergleichbarkeit der Blut- und Leberproben sichergestellt.

Lebergewebe wurde im Rahmen von Lebertransplantationen oder Leberteilresektionen gewonnen, die zugehörigen Blutproben wurden maximal zwei Stunden vor oder nach dem operativen Eingriff entnommen. Lebergewebe wurde direkt nach der jeweiligen Resektion oder Explantation noch im Operationssaal entnommen und gekühlt. Sowohl das Blut als auch die Leberproben wurden innerhalb von 30 Minuten nach der Entnahme verarbeitet.

Alle Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer waren volljährig und hatten nach ärztlich geführter Aufklärung ihre schriftliche Einwilligung zur Studienteilnahme erteilt. Aufklärung und Einwilligungserklärung folgten den Richtlinien der zuständigen Ethikkommission.

Die Blutproben wurden nach einer dichtegradbasierenden Zentrifugation (Ficoll-Hypaque-Zentrifugation) zu peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) aufgearbeitet (Salzberger et al., 2018).

Das Lebergewebe wurde unter Laborbedingungen der Risikogruppe 3 nach einem in unserer Arbeitsgruppe etablierten Protokoll verarbeitet, um die intrahepatischen Leukozyten (IHL) zu separieren (Lunemann et al., 2017). Wenn eine ausreichend große Anzahl an Zellen gewonnen werden konnte, wurden die Leberzellen zur weiteren Aufreinigung mehrfach zentrifugiert, die IHL aus dem Überstand abgetragen und in einem Zellkulturmedium verwahrt. Zur weiteren Phänotypisierung kamen Durchflusszytometrie, Immunfluoreszenz und Analyse der intrazellulären Zytokine in einem Zellkulturmedium zum Einsatz.

### **2.2.1. Durchflusszytometrie**

Für die Phänotypisierung via Durchflusszytometrie wurden jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen der PBMC und der IHL der jeweiligen Patientinnen oder Patienten simultan unter gleichen Konditionen und Grundeinstellungen verarbeitet. Die Auswahl der Antikörper erfolgte auf Grundlage der vorhandenen Literatur, IHL und PBMC wurden jeweils mit den gleichen monoklonalen Antikörpern benetzt.

Die Zellanalyse wurde mit einem BD LSR Fortessa und der FlowJo™ v10 Software (BD Life Sciences) durchgeführt. Um den Rezeptor MARCO detektieren zu können, wurden die PBMC über jeweils fünf und zwei Tage mit einem Monozytenkolonien-stimulierenden Faktor (M-CSF) und Interleukin-10 stimuliert und über die spezifischen Antikörperfluoreszenzen für Monozyten und Makrophagen ebenfalls per Durchflusszytometrie detektiert.

### **2.2.2. Immunfluoreszenz**

Für die Immunfluoreszenz wurden zwei Proben aus den IHL entnommen, fixiert, permeabilisiert und über Nacht mit den Antikörpern für CD49a, CD68, MARCO und VSIG4 inkubiert. Nach einer anschließenden erneuten Waschung konnte ein sekundärer Ziegen/ anti-Kaninchen Antikörper hinzugefügt werden.

Einige Gewebeproben wurden folgend mit dem DNA Fluoreszenzfarbstoff Hoechst gefärbt und per Konfokalmikroskop visualisiert. Nach einer auf der gewebeeigenen Autofluoreszenz basierenden Detektoreinstellung wurden die Gewebedaten per Fiji ImageJ erhoben und weiterführend analysiert, um einen Ausgangswert der Intensität des CD68 Signals festlegen zu können. Abschließend konnten die Signale für VSIG4, MARCO und CD49a an die zuvor festgelegte Signalintensität des CD68 angepasst werden.

### **2.2.3. Analyse der intrazellulären Zytokine**

Mit OptiPrep isolierte Zellen (IHL sowie PBMC) wurden als Zellkultur mit dem über den Toll-like Rezeptor 4 (TLR 4) aktivierenden Lipopolysachharid (LPS) oder dem TLR 7/8 Liganden CL097 in dem Lacton Antibiotikum Brefeldin A (BFA) stimuliert. Die intrazelluläre Färbung mit Antikörpern wurde nach dem Protokoll des Fix & Perm® Cell Fixation & Cell Permeabilization Kit von Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Auch hier wurde das BD LSR Fortessa™ sowie die FlowJo™ v10 Software zur Datengenerierung genutzt.

### **2.2.4. Statistische Analyse**

Die statistische Erhebung wurde per Prism v7.03 vollzogen und auf Grund der geringen Probenanzahl ( $n = 30$ ) als nicht parametrische Analyse dargestellt. Die gepaarten Stichproben wurden per Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verglichen. Zudem wurde das Signifikanzniveau über die FDR Methode von Benjamini und Hochberg angepasst. Lediglich  $p$ -Werte von  $< .05$  wurden als statistisch signifikant gewertet.

## **2.3. Ergebnisse**

### **2.3.1. CD49a wird von intrahepatischen Makrophagen exprimiert.**

Bei der durchflusszytometrischen Phänotypisierung der Blut- und Gewebeproben konnte in allen drei Monozyten-Subpopulationen ein signifikant höherer Anteil der intermediären Monozyten ( $p = .0004$ ) in den IHL gefunden werden. Zudem zeigte sich hier ein verminderter Anteil klassischer Monozyten ( $p = .03$ ). Für die Anteile der nicht-klassischen Monozyten zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Blut und Lebergewebe. Die Expression von CD49a war auf den drei Subpopulationen der IHL gleichermaßen ausgeprägt.

Im Vergleich der IHL mit den PBMC ließ sich jedoch eine signifikant erhöhte Expression von CD49a auf den IHL darstellen ( $p = .002$ ). Zusätzlich zeigte die Population intrahepatischer CD49a<sup>+</sup> Makrophagen gegenüber der CD49a<sup>-</sup> Population eine erhöhte Expression der Aktivierungsmarker CD69 ( $p = .002$ ), CD80 ( $p = .002$ ), CD83 ( $p = .005$ ) und CD86 ( $p = .002$ ), welche lediglich in einem geringen Ausmaß auf den PBMC zu verorten waren.

Somit lässt sich aus unseren Ergebnissen schließen, dass CD49a zur Identifikation intrahepatischer Makrophagen herangezogen werden kann. Ferner lässt sich bei der intrahepatischen CD49a<sup>+</sup> Makrophagenpopulation aufgrund einer vermehrten Expression der Oberflächenmarker CD80, CD83 und CD86 eine zelluläre Aktivierung vermuten.

### **2.3.2. CD49a, VSIG4 und MARCO dienen als Marker für intrahepatische Makrophagen.**

In der Immunfluoreszenz konnten die von uns ausgewählten Marker CD49a, VSIG4 und MARCO auf intrahepatischen CD68<sup>+</sup> Monozyten detektiert werden, die Marker VSIG4 und CD49a ( $r = .2532, p = .0001$ ) sowie VSIG4 und MARCO ( $r = .4018, p = .0001$ ) wurden jeweils co-exprimiert. Diese Ergebnisse konnten bestätigt werden, indem über eine Boolesche Verknüpfung die gemeinsame Expression der drei Marker auf den CD68<sup>+</sup> IHL in jeweils unterschiedlicher Kombination dargestellt wurde. Die anschließend durchgeführte Durchflusszytometrie konnte die Ergebnisse der Immunfluoreszenz bestätigen. Nach Zugabe der entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffe stellte sich auf den CD49a<sup>+</sup> gefärbten intrahepatischen Makrophagen eine gegenüber den PBMC signifikant erhöhte Fluoreszenz (median fluorescence intensity, MdfI) von VSIG4 ( $p = .002$ ) und MARCO ( $p = .004$ ) dar. Überdies wurde eine signifikant erhöhte Expression von CD49a ( $p = .02$ ) und MARCO ( $p = .004$ ) auf den VSIG4<sup>+</sup> gefärbten, sowie von VSIG4 ( $p = .004$ ) und CD49a ( $p = .004$ ) auf den MARCO<sup>+</sup> gefärbten intrahepatischen Makrophagen beobachtet. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Oberflächenmarker CD49a, MARCO und VSIG4 zur Identifizierung intrahepatischer Makrophagen herangezogen werden können.

### **2.3.3. Intrahepatische Makrophagen zeigen eine höhere Aktivität als periphere Makrophagen.**

Um die funktionelle Aktivität der intrahepatischen Makrophagen zu beurteilen, wurden IHL und PBMC mit einem Lipopolysaccharid (LPS) oder CL097 stimuliert, um die Transmembranproteine TLR-4, TLR-7 und TLR-8 zu aktivieren. Im Anschluss wurde die Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-10 und IL-12 per Durchflusszytometrie quantifiziert und mit den unstimulierten Proben verglichen. Bereits in den unstimulierten Proben der IHL zeigte sich im Vergleich zu den PBMC eine vermehrte Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  ( $p = .0003$ ) und IL-12 ( $p = .002$ ), nicht aber von IL-10. Nach der Stimulation mit LPS oder CL097 konnte in beiden Zellreihen gleichermaßen eine signifikant vermehrte Expression von TNF- $\alpha$  gemessen werden ( $p = .004$ ). Die Zytokine IL-12 und IL-10 wiederum zeigten nach der Zugabe von LPS lediglich eine vermehrte Expression in den IHL. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass bei einer bereits auf den unstimulierten IHL vorhandenen, gegenüber PBMC vermehrten Reaktivität, keine signifikante Reaktivitätssteigerung der IHL durch eine Stimulation mit TLR-Liganden herbeigeführt wird.

Im Weiteren wurden intrahepatische CD49a<sup>+</sup> und CD49a<sup>-</sup> Makrophagen im Hinblick auf ihre Reaktivität miteinander verglichen. Dieser Vergleich zeigte sowohl in den unstimulierten als auch in den stimulierten CD49a<sup>+</sup> IHL eine erhöhte Expression von TNF- $\alpha$  ( $p = .02$ ), IL-10 ( $p = .02$ ) und IL-12 ( $p = .008$ ). Nach einer erneuten Booleschen Verknüpfung lässt sich zusammenfassend bestätigen, dass TNF- $\alpha$  allein oder in Kombination mit IL-10 bereits auf unstimulierten CD49a<sup>+</sup> intrahepatischen Makrophagen exprimiert wird. Zusammenfassend ist auch hier ein lediglich leichter Reaktivitätsanstieg in der Population der CD49a<sup>+</sup> IHL durch die Zugabe von Stimulantien zu verorten.

## 2.4. Diskussion

Erkrankungen der menschlichen Leber können mit einem akuten oder chronischen Entzündungsgeschehen und einer zellulären Immunaktivierung einhergehen, welche einer folgenden Gewebsschädigung entgegenwirken kann. In diesem Forschungsprojekt konnte diese zelluläre Immunaktivierung näher betrachtet werden. Primär wurden die an Lebererkrankungen beteiligten gewebsresidenten Monozyten und Makrophagen anhand unterschiedlicher Expressionsmuster bestimmter Oberflächenrezeptoren charakterisiert und von peripheren Monozyten und Makrophagen differenziert.

Monozyten und Makrophagen lassen sich anhand ihrer Oberflächenrezeptoren in differente Subpopulationen unterteilen. Die klassischen Monozyten (CD14<sup>lo</sup>CD16<sup>hi</sup>) verfügen aufgrund der Fähigkeit zur Präsentation spezifischer Antigene über entzündungshemmende Eigenschaften. Zudem verfügt diese Subpopulation ebenso wie die Population der intermediären Monozyten (CD<sup>int-hi</sup>CD<sup>int</sup>) über die Fähigkeit der Phagozytose. Eine quantitative Analyse der gepaarten Proben zeigte eine erhöhte Anzahl intermediärer Monozyten, sowie eine verminderte Anzahl klassischer Monozyten in den IHL.

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob bereits unstimulierte CD49a<sup>+</sup> Makrophagen eine gesteigerte Expression vordefinierter Reifungs- und Aktivierungsmarker zeigen. Als humane Marker für gewebsresidente Makrophagen konnten innerhalb unseres Projektes CD49a, VSIG4 und MARCO sowohl per Durchflusszytometrie als auch per Immunfluoreszenz als Marker für humane leberresidente Monozyten und Makrophagen identifiziert werden. Auf den PBMC konnte eine Expression dieser Marker lediglich in einem geringen Ausmaß dargestellt werden. Zudem ließen sich auf den leberspezifischen CD49a<sup>+</sup> Makrophagen die Aktivierungsmarker CD69, CD80, CD83 und CD86 darstellen, deren Expression auf den CD49a<sup>-</sup> Makrophagen nur unzureichend quantifiziert werden konnte.



Die lebereigenen, humanen Kupffer-Zellen besitzen aufgrund ihrer vielfältigen Funktionalität neben der Immunabwehr ebenso immunsuppressive Eigenschaften. So können diese Immunzellen über eine Überexpression des Fas-Liganden (apoptoseinduzierender Rezeptor) sowohl eine CD8<sup>+</sup> T-Zell Destruktion als auch eine IL-10 induzierte Immunsuppression bewirken (Sun et al., 2003). Trotz dessen zeigen die von uns mit TLR-Liganden stimulierten lebereigenen Kupffer-Zellen im Vergleich der PBMC zu den unstimulierten IHL, keine signifikant vermehrte Zytokinexpression. Diese Beobachtung unterstützt die These, dass durch die Nähe des gastrointestinalen portalen Rückflusses eine immunologische Adaption der hepatischen Immunzellen erfolgt und so die individuellen Eigenschaften der Subpopulationen der Monozyten und Makrophagen beeinflusst werden könnte. Somit kann nach unseren Ergebnissen von einer bereits vorherrschenden Grundreaktivität der leberresidenten CD49a<sup>+</sup> Makrophagen ausgegangen werden.

M1-Makrophagen sind einerseits über die Expression von TNF- $\alpha$  und IL-12 für ihre pro-inflammatorischen Eigenschaften bekannt, während M2-Makrophagen über die Expressionsfähigkeit von IL-10 über entzündungshemmende Eigenschaften verfügen (Italiani & Boraschi, 2014). Die bisher publizierten Daten lassen vermuten, dass die durch LPS stimulierte Zytokinexpression der M1-Makrophagen von Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) abhängig sein könnte (Dobashi et al., 2001), was eine Aktivierung intrahepatischer CD49a<sup>+</sup> Makrophagen durch INF- $\gamma$  produzierende Zellen wie NK- oder T-Zellen denkbar macht. Um die erhobenen Daten weiter zu verifizieren und eine mögliche Aktivierung durch INF- $\gamma$  produzierende Zellen darstellen zu können, wäre eine Erweiterung der Kohorte unter Einbeziehung der zugrundeliegenden Erkrankungen notwendig. Ungeachtet dessen scheinen Menschen, die an einer akuten oder chronischen Lebererkrankung leiden, eine Vielzahl an aktivierten gewebsresidenten Makrophagen in der Leber zu beherbergen.

## 2.5. Zusammenfassung der Ergebnisse

In diesem Projekt wurden assoziierte humane Leber- und Blutproben in Bezug auf Monozyten und Makrophagen quantitativ und phänotypisch überprüft. Die phänotypische Untersuchung ergab eine signifikant erhöhte Expression der intermediären Monozyten. Der Anteil der klassischen Monozyten zeigte sich auf den IHL vermindert, die nicht-klassischen Monozyten zeigten keine Anteilsdifferenz in den beiden Probenotypen. Weiterhin wurden leberresidente Makrophagen (Kupffer-Zellen) auf Grundlage der Oberflächenmarker CD49a, VSIG und MARCO differenziert und im Hinblick auf ihre immunologische Aktivität und Funktionalität mit peripheren Makrophagen verglichen. Diese Oberflächenmarker konnten sowohl per Durchflusszytometrie als auch per Immunfluoreszenz vermehrt auf den IHL dargestellt und als Marker für humane leberresidente Makrophagen identifiziert werden.

Ein direkter Vergleich der CD49a<sup>+</sup> Populationen beider Zelltypen zeigte eine vermehrte Expression der Aktivierungsmarker CD69, CD83, CD80 und CD86 sowie der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-12 auf den CD49a<sup>+</sup> IHL. Eine zusätzliche Stimulation der CD49a<sup>+</sup> IHL mit unterschiedlichen TLR-Liganden (LPS oder CL097) bewirkte keine vermehrte Expression der Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-10 und IL-12. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass humane leberresidente CD49a<sup>+</sup> Makrophagen im Vergleich zur CD49a<sup>-</sup> Population bereits unstimuliert eine vermehrte Grundreaktivität und Aktivität aufweisen.

## 2.6. Result summary

In this project, associated human liver and blood samples were quantitatively and phenotypically analyzed with a focus to monocytes and macrophages. Phenotypic examination revealed significantly higher expression of intermediate monocytes. The proportion of classical monocytes was shown to be decreased on IHL, and non-classical monocytes showed no difference in proportion between the two sample types. Furthermore, liver-resident macrophages (Kupffer cells) were differentiated using the surface markers CD49a, VSIG, and MARCO and compared with peripheral macrophages with a view to their immunological activity and functionality. These surface markers were shown to be increased on CD49a<sup>+</sup> IHL by both flow cytometry and immunofluorescence and were identified as markers for human liver-resident macrophages.

Direct comparison of CD49a<sup>+</sup> populations of both cell types showed increased expression of the activation markers CD69, CD83, CD80, and CD86 and the cytokines TNF- $\alpha$  and IL-12 on IHL. Additional stimulation of CD49a<sup>+</sup> IHL with different TLR ligands (LPS or CL097) did not cause increased expression of the cytokines TNF- $\alpha$ , IL-10 and IL-12. These results suggest that human liver resident CD49a<sup>+</sup> macrophages already present baseline reactivity and activity when unstimulated.

## 2.7. Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen presenting cell
BFA	Brefeldin A
CD	Cluster of differentiation
DNA	Deoxyribonucleic acid
FDR	False Discovery Rate
HSC	Hepatic stellate cell
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IHL	Intrahepatische Lymphozyten
IL	Interleukin
KC	Kupffer Zellen
LSEC	Liver sinusoidal endothelial cells
LPS	Lipopolysaccharid
MdFI	Median fluorescence intensity
MPS	Mononukleär-phagozytäres System
M-CSF	Makrophagen stimulierender Faktor
MARCO	Innate activation marker of macrophages
NK-Zellen	Natürliche Killerzelle
p-Wert	lat. Probabilitas. Statistischer Wert für Wahrscheinlichkeit
PPR	Pattern Recognition Receptor
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
RNA	Ribonucleic acid
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha

## 2.8. Literaturverzeichnis

Crispe, I. N. (2009). The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol*, 27, 147-163.

Dey, A., Allen, J., & Hankey-Giblin, P. A. (2014). Ontogeny and polarization of macrophages in inflammation: blood monocytes versus tissue macrophages. *Front Immunol*, 5, 683.

Dobashi, K., Aihara, M., Araki, T., Shimizu, Y., Utsugi, M., Iizuka, K., et al. (2001). Regulation of LPS induced IL-12 production by IFN-gamma and IL-4 through intracellular glutathione status in human alveolar macrophages. *Clin EXP Immunol*, 124:290-6.

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

Liao, Y., Guo, S., Chen, Y., Cao, D., Xu, H., Yang, C., Fei, L., Ni, B., & Ruan, Z. (2014). VSIG4 expression on macrophages facilitates lung cancer development. *Lab Invest*, 94(7), 706-715.

Lunemann, S., Martrus, G., Goebels, H., Kautz, T., Langeneckert, A., Salzberger, W., Koch, M., M, J. B., Nashan, B., van Gisbergen, K., & Altfeld, M. (2017). Hobit expression by a subset of human liver-resident CD56(bright) Natural Killer cells. *Sci Rep*, 7(1), 6676.

MacParland, S. A., Liu, J. C., Ma, X. Z., Innes, B. T., Bartczak, A. M., Gage, B. K., Manuel, J., Khuu, N., Echeverri, J., Linares, I., Gupta, R., Cheng, M. L., Liu, L. Y., Camat, D., Chung, S. W., Seliga, R. K., Shao, Z., Lee, E., Ogawa, S., McGilvray, I. D. (2018). Single cell RNA sequencing of human liver reveals distinct intrahepatic macrophage populations. *Nat Commun*, 9(1), 4383.

Manzella, A., Ohtomo, K., Monzawa, S., & Lim, J. H. (2008). Schistosomiasis of the liver. *Abdom Imaging*, 33(2), 144-150.

Mukherjee, R., Kanti Barman, P., Kumar Thatoi, P., Tripathy, R., Kumar Das, B., & Ravindran, B. (2015). Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Rep*, 5, 13886.

Salzberger, W., Martrus, G., Bachmann, K., Goebels, H., Hess, L., Koch, M., Langeneckert, A., Lunemann, S., Oldhafer, K. J., Pfeifer, C., Poch, T., Richert, L., Schramm, C., Wahib, R., Bunders, M. J., & Altfeld, M. (2018). Tissue-resident NK cells differ in their expression profile of the nutrient transporters Glut1, CD98 and CD71. *PLOS ONE*, *13*(7), e0201170.

Sica, A., & Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*, *122*(3), 787-795.

Sun, Z., Wada, T., Maemura, K., Uchikura, K., Hoshino, S., Diehl, A.M., et al. (2003). Hepatic allograft derived Kupffer cells regulate T cell response in rats. *Liver Transpl*, *9*:489-97.

Tacke, F., & Zimmermann, H. W. (2014). Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *J Hepatol*, *60*(5), 1090-1096.

Vogt, L., Schmitz, N., Kurrer, M. O., Bauer, M., Hinton, H. I., Behnke, S., Gatto, D., Sebbel, P., Beerli, R. R., Sonderegger, I., Kopf, M., Saudan, P., & Bachmann, M. F. (2006). VSIG4, a B7 family-related protein, is a negative regulator of T cell activation. *J Clin Invest*, *116*(10), 2817-2826.

Zigmond, E., Samia-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. *J Immunol*, *193*(1), 344-353.

### **3. Erklärung des Eigenanteils**

Zu Beginn meiner Promotionstätigkeit am Leibniz-Institut für Virologie habe ich eine eigenständige Literaturrecherche durchgeführt. Hieraus entwickelte sich eine Projektskizze, welche durch Herrn Prof. Dr. M. Altfeld, Herrn Dr. S. Lunemann und Frau Dr. G. Martrus optimiert und ergänzt wurde. Der Ethikantrag wurde bereits im Vorfeld durch Herrn Prof. Dr. M. Altfeld und Herrn Dr. T. Kautz erarbeitet und implementiert.

Die klinische Betreuung und Bereitstellung der Proben erfolgte durch Frau Prof. Dr. M. Koch, Herrn Prof. Dr. B. Nashan und Herrn Prof. Dr. K. J. Oldhafer. Die Entnahme der Proben und weitere Verarbeitung und Organisation führte ich zusammen mit Frau Dr. G. Martrus, Herrn Dr. S. Lunemann, Herrn Dr. W. Salzberger, Frau Dr. A. Langeneckert, Herrn Dr. L. Hess, Frau A. Ziegler, Herrn S. Löbl, Frau K. Russu, Herrn Dr. T. Poch, Frau Dr. J. Kah und Herrn F. Flomm durch. Die Datenerhebung und die statistischen Analysen wurden durch mich, Frau Dr. G. Martrus und Herrn Dr. S. Lunemann durchgeführt.

Die Originalarbeit wurde durch Frau Dr. G. Martrus, Herrn Dr. S. Lunemann und Herrn Prof. Dr. M. Altfeld erarbeitet. Zusätzlich wurde die Korrektur sowie die Durchführung der Rezensionen durch mich und Frau Dr. G. Martrus, Herrn Dr. S. Lunemann, Herrn Dr. W. Salzberger, Frau Dr. A. Langeneckert, Frau Dr. J. Kah, Herrn F. Flomm, Frau A. Ziegler, Frau Dr. A. Niehrs, Herrn S. Löbl, Frau K. Russu, Herrn Dr. L. Hess, Herrn T. Poch, Herrn Prof. Dr. B. Nashan, Herrn Prof. Dr. C. Schramm, Herrn Prof. Dr. K. J. Oldhafer, Frau Prof. Dr. M. Dandri, Frau Prof. Dr. M. Koch und Herrn Prof. Dr. M. Altfeld durchgeführt.



#### **4. Danksagung**

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Marcus Altfeld, der mich zu allen Zeiten dieses Projekts unterstützt und gefördert hat. Insbesondere seine langwierige Erfahrung und die damit einhergehende interprofessionelle Kommunikation mit den klinischen Kolleginnen und Kollegen sowie anderen Forschungsgruppen hat zu der erfolgreichen Fertigstellung dieser Promotionsarbeit beigetragen. Ich habe mich zu jeder Zeit am Leibniz-Institut für Virologie gut aufgehoben gefühlt. Die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Abteilung für Virus Immunologie um Herrn Prof. Dr. Marcus Altfeld waren stets hochmotiviert und haben mich ausnahmslos kollegial unterstützt. Insbesondere das „Leber-Team“ hat zu jeder Tages- und Nachtzeit Hand in Hand gearbeitet.

Zudem möchte ich mich ausdrücklich bei meinen Betreuern Herrn Dr. S. Lunemann und Frau Dr. G. Martrus bedanken, welche jederzeit ein offenes Ohr für neue Ideen und allerlei Fragestellungen meinerseits hatten – und mit denen ich gemeinsam alle Hürden des Projektes überwinden konnte.

Ohne die Zusammenarbeit mit den klinischen Kolleginnen und Kollegen aus der Klinik für Hepatobiliäre- und Transplantationschirurgie des UKE, Herrn Prof. Dr. B. Nashan, Frau Prof. Dr. M. Koch sowie der Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie der Asklepios-Klinik Barmbek, Herrn Prof. Dr. K. J. Oldhafer und die beteiligten Patientinnen und Patienten, wäre dieses Projekt nicht möglich gewesen.

Ebenso gilt ein besonderer Dank der I. Medizinischen Klinik des UKE, Herrn Prof. Dr. A. Lohse, Herrn Prof. Dr. C. Schramm, Herrn Prof. Dr. H. Wege, Herrn Dr. M. Sebode sowie Frau Dr. A. Reiter.

Nicht zuletzt danke ich allen Beteiligten des Graduiertenkollegs des Sonderforschungsbereichs 841 des UKE, insbesondere Frau Prof. Dr. G. Tiegs und Frau Prof. Dr. M. Dandri, sowie für die in diesem Zusammenhang stehende finanzielle Unterstützung durch ein Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG).

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinem Lebensgefährten Tim bedanken. Dieser hat mich zu jeder Tages- und Nachtzeit bei der Durchführung des Projektes unterstützt.

## 5. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Geburtsort: Henstedt-Ulzburg  
Geburtsdatum: 23.03.1986  
Familienstand: liiert, 2 Kinder  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Studium

10/2012 – 06/2020 Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg  
10/2015 – 09/2016 Promotion im Rahmen des Graduiertenkollegs der  
Universität Hamburg, Sonderforschungsbereich 841  
am Leibniz-Institut für Virologie Hamburg

### Beruflicher Werdegang

07/2020 – heute Ärztin in Weiterbildung am Institut für Rechtsmedizin,  
Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf  
11/2011 – 02/2019 Interdisziplinäre Intensivstation  
Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf  
04/2011 – 10/2011 Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie  
Technische Universität München  
04/2010 – 03/2011 Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

### Ausbildung

04/2007 – 03/2010 Ausbildung zur Gesundheits- und Krankenpflegerin  
Asklepios-Klinik Nord, Hamburg

### Praktika

08/2006 – 11/2006 Au Pair Brooklyn, New York  
08/2005 – 02/2006 Freiwilliges Soziales Jahr  
Arbeiter Samariter Bund Hamburg

### Schulabschluss

06/2005 Abitur am Gymnasium Ohmoor Hamburg

## **6. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....