



Fakultät für Medizin der Technischen Universität München

# Precision-cut Liver Slices zur Untersuchung zellautonomer antiviraler Abwehr von Hepatozyten ex vivo bei erhaltenen zellulären dreidimensionalen Interaktionen

Marcus Brugger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizinischen Wissenschaft genehmigten Dissertation.

Vorsitz: apl. Prof. Dr. Klaus-Peter Janssen

Prüfer\*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Percy A. Knolle
2. Priv.-Doz. Dr. Carolin Mogler

Die Dissertation wurde am 29.11.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.03.2022 angenommen.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>4</b>
<b>I. Einleitung</b> .....	<b>5</b>
1. Die Leber – ein immunregulatorisches Organ .....	5
2. Mikroarchitektur der Leber und Immunantwort .....	6
3. TNF-induzierter Zelltod in virusinfizierten Hepatozyten .....	8
4. Precision-cut Liver Slices – ein vielseitiges <i>ex vivo</i> Tool .....	12
4.1 Der Weg von manuell hergestellten Leberschnitten hin zu Precision-cut Liver Slices .....	12
4.2 Anwendungsbereiche von Precision-cut Liver Slices .....	13
4.3 Vor- und Nachteile in der Anwendung von Precision-cut Liver Slices .....	15
4.4 Precision-cut Liver Slices als Möglichkeit zur Reduktion von Versuchstieren.....	16
<b>II. Ziele der Arbeit</b> .....	<b>18</b>
<b>III. Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
1. Material.....	19
1.1 Geräte .....	19
1.2 Verbrauchsmaterialien.....	20
1.3 Kit-Systeme .....	21
1.4. Chemikalien und Reagenzien.....	22
1.5 Puffer und Medien .....	23
1.6 Mausmodel und Tierhaltung .....	25
1.7 Rekombinante Adenoviren .....	25
1.8 Computersoftware .....	25
1.9 Antikörper .....	26
1.10 Rekombinante Proteine .....	27
1.11 Mauslinie .....	27
1.12 Zelllinie .....	27
2. Methoden.....	28
2.1 Virale Infektion.....	28
2.2 <i>In vivo</i> und <i>ex vivo</i> Biofluoreszenzmessung .....	28
2.3 Organentnahme .....	28
2.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen .....	28
2.5 Bestimmung der Caspasen-Aktivität.....	29
2.6 Bestimmung von LDH.....	29
2.7 Histologie .....	30

2.8 Statistik.....	30
2.9 Bestimmung von ATP.....	30
2.10 Herstellung muriner Precision-cut Liver Slices.....	31
2.11 Inkubation muriner Precision-cut Liver Slices .....	33
2.12 Erstellung von Bioenergetischen Profilen mithilfe eines O2k Respirators .....	35
2.13 Herstellung humaner Precision-cut Liver Slices.....	36
2.14 Inkubation humaner Precision-cut Liver Slices .....	37
2.15 Western Blot Analyse .....	38
2.16 Adenovirus-Produktion .....	39
<b>IV. Ergebnisse.....</b>	<b>40</b>
1. Etablierung und Viabilität des Schnittkulturmodells .....	40
2. Adenovirus-Infektion von Precision-cut Liver Slices zur Studie der nicht-kanonischen CD8 T-Zell-Effektorfunktion.....	44
3. TNF führt zu Apoptose in virusinfizierten Precision-cut Liver Slices .....	46
4. Inhibitoren des NOX–Signalweges reduzieren die Caspase 3-Aktivität in virusinfizierten Precision-cut Liver Slices nach TNF Applikation .....	50
5. Bioenergetische Funktionalität von Mitochondrien in nicht infizierten und virusinfizierten Precision-cut Liver Slices.....	52
6. Übertragung der SOPs auf humane Precision-Cut Liver Slices.....	56
7. Precision-cut Liver Slices zur Untersuchung des CGRP-RAMP1-Signalweges nach partieller Hepatektomie .....	59
<b>V. Diskussion.....</b>	<b>62</b>
1. Viabilität von Precision-cut Liver Slices .....	64
2. TNF induziert Zelltod in virusinfizierten Precision-cut Liver Slices .....	67
3. Precision-cut Liver Slices zur Untersuchung von zellautonomer antiviraler Immunität in infizierten Hepatozyten .....	69
4. Mitochondriale Fitness in Precision-cut Liver Slices .....	70
5. Übertragung der SOPs auf humane Precision-cut Liver Slices.....	71
6. Precision-cut Liver Slices zur Reduktion von Tierversuchen .....	74
7. „Organ in a slice“- Quo vadis?.....	76
8. Werden Precision-cut Liver Slices bald traditionelle <i>in vitro</i> Methoden verdrängen? .....	77
<b>VI. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>79</b>
<b>VII. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>93</b>
<b>VIII. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>94</b>
<b>IX. Vorveröffentlichungen .....</b>	<b>97</b>



# Zusammenfassung

Die antivirale Immunüberwachung in der Leber umfasst ein komplexes Netzwerk von verschiedenen Immunzellpopulationen, die bei Entzündungen in der Leber rekrutiert werden und an der lokalen Antigenpräsentation sowie an Effektorfunktionen beteiligt sind. Dabei besitzen insbesondere Hepatozyten die Kompetenz, ihre Reaktion auf die Induktion von Zelltod durch Signale, die von Effektorzellen freigesetzt werden, dynamisch und zellautonom anzupassen. Somit besitzt die Leber ein eigenes antivirales Überwachungssystem, das sich in den Parenchymzellen der Leber befindet (Lampf et al., 2020; Wohlleber et al., 2012). Es wurde bislang kein geeignetes *in vitro*-Modell etabliert, mit dem diese zellautonomen Funktionen der Leber hinsichtlich Zell-Signalweiterleitungen, Zellüberleben und Zelltod untersucht werden können.

In der vorliegenden Arbeit wird zur Untersuchung dieser zellautonomen Funktionen der Leber ein standardisiertes Modell in Form von murinen und humanen Precision-cut Liver Slices (PCLS) etabliert und diskutiert. Für die Untersuchung dieser Funktionen sind das physiologische Milieu sowie die Mikroarchitektur der Leber entscheidend. Leberzellen erfüllen komplexe Stoffwechsel- und Immunfunktionen innerhalb der hepatischen Mikroarchitektur und die Positionierung der Zelle scheint mit bestimmten Funktionen in Zusammenhang zu stehen (Gebhardt, 1992; Gola et al., 2021), was auch eine Erklärung dafür liefern könnte, warum bestimmte *in vivo* beobachtete Zellfunktionen unter *in vitro*-Bedingungen bei isolierten Zellpopulationen nicht nachweisbar sind. Mithilfe des etablierten Schnittkulturmodells besteht die Möglichkeit, eben diese Mikroarchitektur der Leber zu erhalten und ein komplexes Zusammenspiel von Zell-Zell-Kommunikation zu gewährleisten. Das System ermöglicht somit die Untersuchung komplexer Zellfunktionen der Leber und stellt somit einen entscheidenden Vorteil gegenüber isolierten Hepatozyten in Zellkultur dar in denen Zell-Zell-Interaktionen ausbleiben.

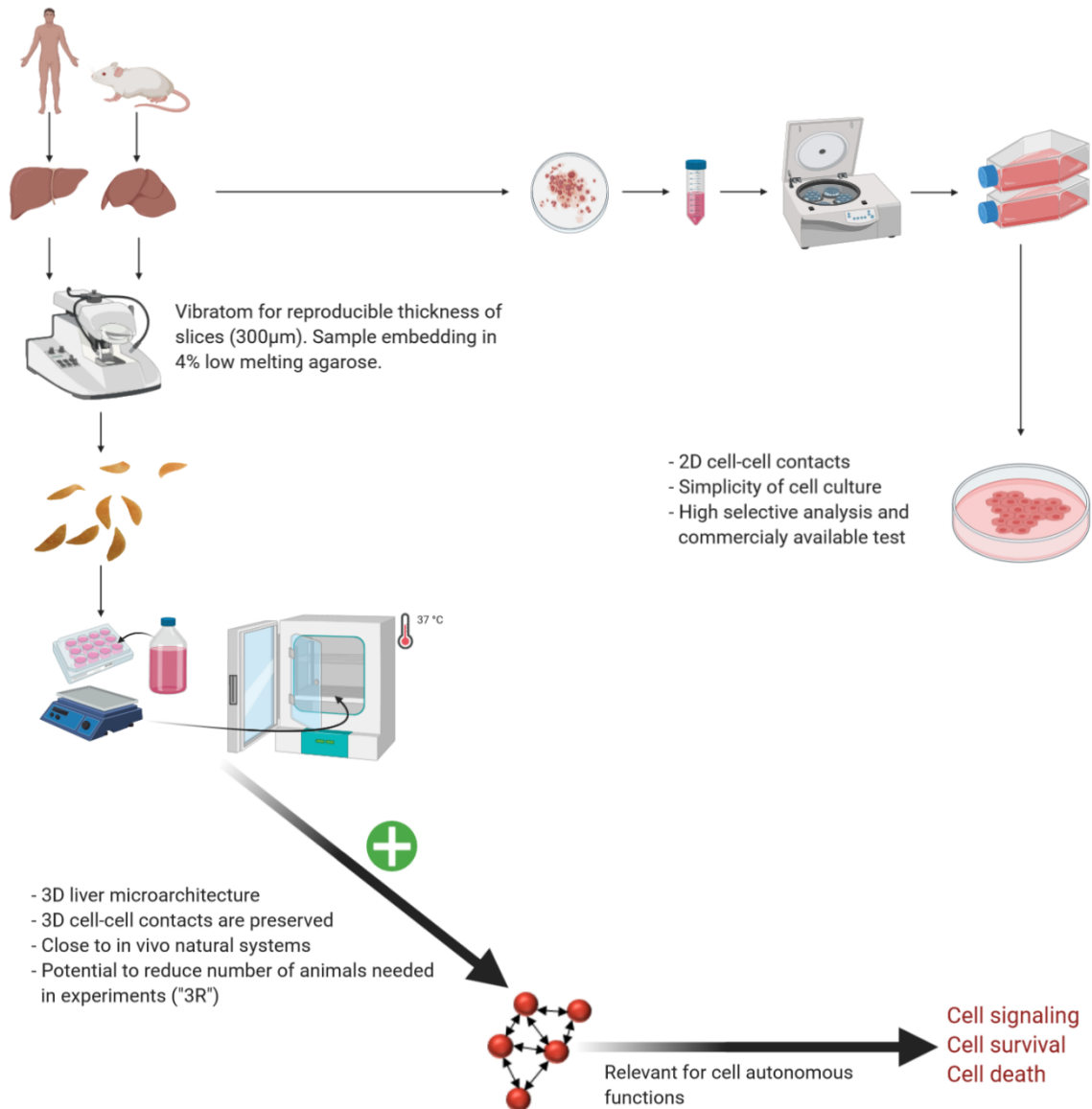
Durch die Anwendung eines Vibratoms (Leica VT 1000S) und die Einbettung der Leber in 4%iger Agarose können reproduzierbare Organschnitte mit einer Dicke von 300 µm gewebeschonend, effizient und kostengünstig hergestellt werden. Die Anwendung von low melting-Agarose gewährleistet ein schnelles und gewebeschonendes Aushärten der Agarose. Die Schonung des Gewebes wird zusätzlich durch die Anwendung von Custodiol® als Schneidepuffer und einer ausreichenden Kühlung verstärkt. Die

Inkubation der PCLS erfolgt in Williams Medium mit L-Glutamine und 2,24g/L NaHCO<sub>3</sub> bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>. Zur gleichmäßigen Verteilung von Stimulatoren und Inhibitoren sowie zur Beseitigung abgestorbener Zellfragmente kommt während der Inkubation eine programmierbare Schüttelplatte zum Einsatz.

Als Proof of Concept (PoC) wurde mit der Anwendung des etablierten Systems die nicht-kanonische CD8 T-Zell-Effektorfunktion untersucht, die einen zellautonomen Abwehrmechanismus beschreibt, der unabhängig von der klassischen Antigenpräsentation in virusinfizierten Zellen zur spezifischen Eliminierung von infizierten Hepatozyten führt (Wohlleber et al., 2012). Diese TNF-Rezeptor I vermittelte Reaktion wird durch die Stimulation von TNF und die Blockierung von Signalwegen durch Inhibitoren an virusinfizierten PCLS untersucht.

Des Weiteren gibt die Arbeit einen Einblick in die breiten Anwendungsbereiche von PCLS und deren Zukunftspotential und zeigt die Möglichkeiten von „Organ in a slice“. Zusätzlich wird die Problematik beleuchtet, warum sich PCLS noch keine feste Position als *in vitro*-Instrument in der universitären und industriellen Forschung erarbeiten konnten und gut etablierte Systeme wie isolierte Hepatozyten verdrängt haben.

## Zusammenfassung



**Abbildung 1: Graphische Zusammenfassung der Key Points**

Die Grafik zeigt die Schlüsselemente der Methode in der Herstellung von Precision-cut Liver Slices und den Vorteil durch den Erhalt von Zell-Zell-Interaktionen, die eine wesentliche Rolle in den anschließenden Untersuchungen von autonomen Zellfunktionen hinsichtlich Aktivierung und Zelltod spielen. Die Abbildung 1 wurde mit BioRender.com erstellt.



## Abstract

Cross-presentation of antigen released from adenovirus-infected hepatocytes by liver sinusoidal endothelial cells stimulates cross-primed effector CTLs to release tumor necrosis factor (TNF), which kills virus-infected hepatocytes through caspase activation. This new form of hepatocytes in detecting viral infection was found in the preclinical mouse model. For this mechanism, no special DAMP or PAMP receptors are necessary. Changing the metabolic function of virus-infected cells, that leads to mitochondrial dysfunction of these hepatocytes, is a complex process. Due to higher vulnerability of the mitochondria we can observe a fast and high selective apoptosis induced by the TNF receptor in virus-infected cells but not in healthy hepatocytes. However, this new form of *Immune Sensing* requires the physiological liver milieu and microanatomy of the liver. Here, we developed a standardized slice culture model that allows us to study the relevance of particular inhibitors of death signaling in virus-infected hepatocytes subjected to TNFR signaling in the complex three-dimensional liver microarchitecture of precision cut liver slices of mice. Higher cell death could be shown in virus-infected hepatocytes when treated with TNF, compared to non-infected healthy hepatocytes after TNF treatment using a caspase assay. In addition, decrease in caspase activation after using Luteolin as an inhibitor, gives the sign that Reactive Oxygen Species play a main role in TNFR signaling. Comprehensively, this model gives us the prospect of performing *ex vivo* experiments focusing on different cell signaling pathways in human liver slices.

# I. Einleitung

## 1. Die Leber – ein immunregulatorisches Organ

Als zweitgrößtes Organ unseres Körpers, wird die Leber gerne als „biochemische Fabrik“ und „Entgiftungsstation“ bezeichnet. In dieser „Fabrik“ laufen zahlreiche Stoffwechselreaktionen ab, werden Nährstoffe gespeichert und bestimmte Stoffe wie z.B. Gerinnungsfaktoren, Lipide, Ketonkörper und viele weitere produziert. Darüber hinaus spielt die Leber als exogene Drüse (Gallebildung) eine wichtige Rolle in der Biotransformation und übernimmt auch endokrine Funktionen wie z.B. die Vitamin-D<sub>3</sub>-Hydroxilierung (Silbernagl & Lang, 2010). Die Leber liegt überwiegend im rechten Oberbauch und wird von einer Organkapsel umgeben (Tunica fibrosa), von der aus Bindegewebssepten die Leber in vier Leberlappen untergliedern. Neben der makroskopisch sichtbaren Gliederung in Lappen, wird die Leber funktionell in acht Segmente unterteilt. Diese Einteilung ergibt sich durch das Verzweigungsmuster der Leitungsbahn-Trias mit Ästen der V. portae hepatis, A. hepatica propria und Gallengängen. Neben dem sauerstoffreichen Blut aus der A. hepatica propria gelangt nährstoffreiches Blut aus der V. portae hepatis (Pfortader) in die Leber. Die Pfortader bildet sich aus dem Zusammenschluss von V. mesenterica superior und V. splenica (Messmann, 2020)

Auch aus immunologischer Sicht ist die Leber ein interessantes Organ. Die einzigartige Mikroarchitektur und bestimmte sinusoidale Endothelzellen der Leber (LSEC) modulieren gemeinsam mit Hepatozyten aktive lokale Immunantworten in der Leber und bestimmen dabei über das Ergebnis der hepatischen Immunantworten (Knolle & Thimme, 2014). Dabei muss die Leber die richtige Balance zwischen der Toleranz einer großen Anzahl von Antigenen, die durch das Blut über die Pfortader aus dem Magen-Darm-Trakt in die Leber gelangen und der effizienten Beseitigung pathogener Mikroorganismen, finden (Knolle & Gerken, 2000).

## 2. Mikroarchitektur der Leber und Immunantwort

In der Leber finden sich neben Hepatozyten, die mit ca. 60% den größten Anteil an Zellen in der Leber bilden, auch LSEC, Kupffer-Zellen, Ito-Zellen, dendritische Zellen sowie hepatische Lymphozyten. LSEC sind residente sinusoidale Endothelzellen, welche die Sinusoide der Leber auskleiden und in ständigem Kontakt mit Leukozyten stehen.

LSEC übernehmen dadurch eine wichtige Rolle in der Immuntoleranz der Leber. Sie sind mit zahlreichen „Scavenger“-Rezeptoren ausgestattet und sorgen für eine effiziente Antigenaufnahme in die Zellen (Knolle & Limmer, 2003). LSEC tragen somit zur Reinigung des Blutes von Antigenen, aber auch gealterten Zellen und bakteriellen Abbauprodukten bei (Smedsrod, 2004). Anatomisch wird diese Reinigung des Blutes durch die einzigartige Endothelauskleidung und das Fehlen einer Basalmembran begünstigt. LSEC bilden dabei sogenannte *Fenestrae* aus und sorgen somit für eine direkte Verbindung zum Zwischenraum von LSEC und Hepatozyten (Disse-Raum). Diese *Fenestrae* haben einen Durchmesser von ungefähr 0,1 µm und sorgen für einen Filter-Effekt, vor allem wenn Partikel in dieser Größenordnung die Leber passieren. Diese besondere Art von Endothelzellen findet sich in keinem anderen Organ (Wisse, De Zanger, Charels, Van Der Smissen, & McCuskey, 1985). Kupffer-Zellen sind residente Makrophagen der Leber, die sich während der Embryogenese von Erythromyeloid-Vorläuferzellen ableiten, anschließend die Leber besiedeln und sich dort als selbst erneuernde Makrophagen-Population etablieren (Mass et al., 2016). Als phagozytierende Zellen sind sie für die Beseitigung von Pathogenen zuständig. Sie sind meist in den Sinusoiden der Leber lokalisiert und stehen im direkten Kontakt zum Blut und darin zirkulierenden Lymphozyten. Neuesten Untersuchungen zufolge, könnte es während einer Leberschädigung oder einer Infektionen zu einem Austausch von Kupffer-Zellen durch Monozyten-abgeleiteten Makrophagen kommen (Alazawi & Knolle, 2018). Im Rahmen dessen, könnte bei der Abwehr einer viralen Hepatitis, das bislang verkannte Interferon (IFN-I) in der Funktionalität von Kupffer-Zellen eine wichtige Rolle spielen (Borst et al., 2018).

Als Folge chronischer viraler Infektionen der Leber kann sich eine Leberzirrhose mit gefährlichen Komplikationen wie einer portalen Hypertension und einer Ösophagusvarizenblutung, Aszites oder ein hepatorenales Syndrom entwickeln (*Duale Reihe Innere Medizin*, 2018). Im weiteren Verlauf kann sich auch ein

## I. Einleitung

hepatozelluläres Karzinom ausbilden (Pinter, Trauner, Peck-Radosavljevic, & Sieghart, 2016). Ito-Zellen spielen in der Entstehung der Leberzirrhose eine entscheidende Rolle. Nach einer Leberschädigung oder *in vitro* werden diese Zellen aktiviert und differenzieren sich von Vitamin-A-speichernden Zellen zu Myofibroblasten, welche proliferativ, entzündlich und chemotaktisch agieren und durch eine verstärkte Produktion von extrazellulärer Matrix (ECM) gekennzeichnet sind (Puche, Saiman, & Friedman, 2013). Ito-Zellen sind im sogenannten Disse-Raum lokalisiert und machen rund 10 % aller residenten Zellen der Leber aus (Wake, 1971). Zusätzlich können Ito-Zellen auch T-Zellen aktivieren (Winau et al., 2007).

Als weitere Zellpopulation sind die Lymphozyten mit durchschnittlich ungefähr  $10^{10}$  Lymphozyten in der menschlichen Leber vertreten und enthalten Lymphozyten des angeborenen (NK- und NKT-Zellen) und adaptiven Immunsystems (B- und T-Zellen). Konventionelle T-Zellen umfassen CD8-positive und CD4-positive T-Zellen. CD8-positive T-Zellen kommen dabei häufiger vor als CD4-positive T-Zellen. Beide Populationen zeigen ein vielseitiges Repertoire von T-Zellen mit  $\alpha\beta$ -Ketten T-Zell-Rezeptoren, welche durch MHC I und II repräsentierte Antigene erkennen (Racanelli & Rehermann, 2006).

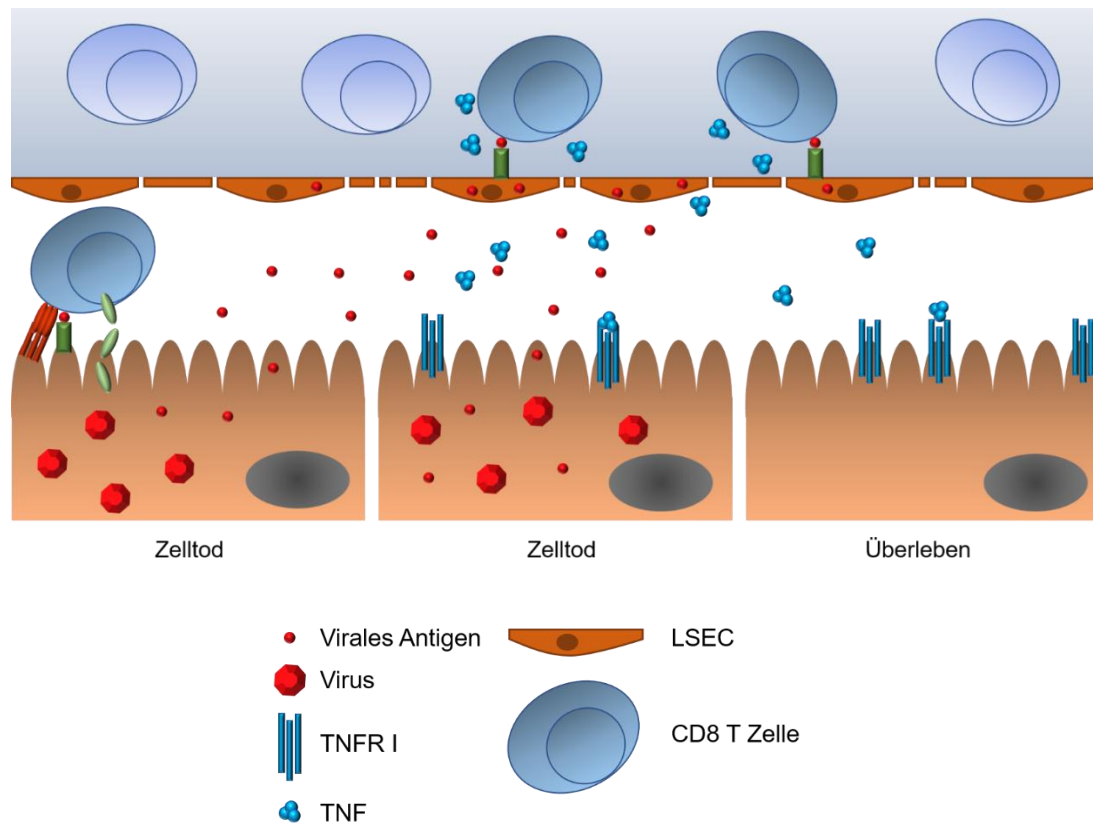
Die Präsentation von Antigenen wird unter anderem von dendritischen Zellen der Leber übernommen. Dabei können sowohl CD8-positive myeloide, als auch CD8-positive lymphoide dendritische Zellen Antigene im Sinusoid aufnehmen und anschließend T-Zellen präsentieren (O'Connell, Morelli, Logar, & Thomson, 2000; Sumpter, Abe, Tokita, & Thomson, 2007).

Virale Infektionen der Leber durch Hepatitis-Viren die speziell Hepatozyten befallen, sind sehr häufig (Protzer, Maini, & Knolle, 2012; Rehermann & Nascimbeni, 2005). Aber auch Adenoviren und Influenzaviren können Hepatozyten befallen (Polakos et al., 2006). Während viele virale Infektionen schnell unter Kontrolle gebracht und durch ein effektives Zusammenspiel zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem eliminiert werden, gibt es andererseits viele Patienten, die an einer chronischen Hepatitis leiden. Aber auch akute Infektionen mit Hepatitis-Virus A und E werden oft erst nach Monaten eliminiert (Lanford et al., 2011). Weltweit leiden nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation mehr als 500 Millionen Patienten an einer chronischen Hepatitis B und C.

### 3. TNF-induzierter Zelltod in virusinfizierten Hepatozyten

Bei der Eliminierung virusinfizierter Zellen spielen virusspezifische CD8-positive zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) eine wesentliche Rolle. Als Teil des adaptiven Immunsystems können sie sowohl durch zytolytische als auch durch nicht-zytolytische Effektorfunktionen zur Bekämpfung von Viren beitragen. Bei viralen Hepatitiden bestimmen CTL durch ihre zytotoxischen Effektorfunktionen den Grad der Leberschädigung und damit den Krankheitsverlauf (Knolle & Thimme, 2014). Diese zytotoxischen Effektorfunktionen erfordern einen direkten Zellkontakt von CTL mit der virusinfizierten Zelle. Dabei wird das virale Antigen auf MHC-I-Molekülen präsentiert und durch den T-Zell-Rezeptor (TCR) der T-Zelle erkannt (Bossi et al., 2002). Neben der beschriebenen kanonischen zytotoxischen Effektorfunktion, die abhängig von einer Antigenpräsentation ist, existiert eine nicht-kanonische zytotoxische Effektorfunktion, unabhängig einer Antigenpräsentation (**Abbildung 2**). Dabei kommt es bei virusinfizierten Hepatozyten zu einer Aktivierung von T-Zellen durch Kreuzpräsentation viraler Antigene durch sinusoidale Endothelzellen der Leber (LSEC). Anschließend findet selektiv in virusinfizierten Hepatozyten eine Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und eine Ausschüttung von Tumornekrosefaktor (TNF) aus aktivierten T-Zellen statt. Dieser Vorgang führt zum Zelltod virusinfizierter Leberzellen. Bei gesunden, nicht virusinfizierten Hepatozyten bleibt hingegen der Zelltod bei TNF-Ausschüttung aus. Somit setzt die nicht-kanonische Effektorfunktion eine Virusinfektion voraus (Wohlleber et al., 2012). In Veröffentlichungen von Wohlleber et al. (2012) konnte bereits gezeigt werden, dass ausschließlich die Stimulation von TNFR1 am Zelltod beteiligt ist. Ebenso konnte in Untersuchungen ein sekundärer Effekt, wie z.B. durch Aktivierung von Immunzellen zur Zelltod-Induktion durch TNF ausgeschlossen werden (Wohlleber et al., 2012).

## I. Einleitung



**Abbildung 2: Klassische und nicht-kanonische CD8 T-Zell-Effektorfunktion**

Kreuzpräsentation viraler Antigene (rot) durch LSEC führt zur Aktivierung virus-spezifischer CD8 T-Zellen und einer Ausschüttung von TNF (blau). TNF bindet an den TNFR1 und führt zum Zelltod in virusinfizierten Hepatozyten, nicht aber in gesunden, nicht infizierten Hepatozyten.

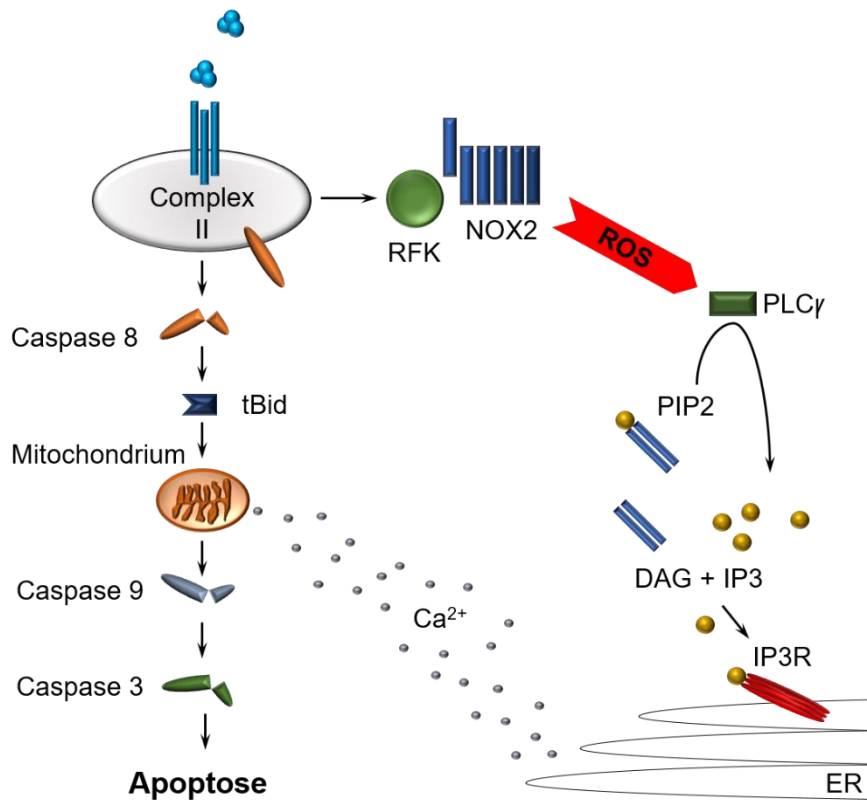
Der Tumornekrosefaktor (TNF), der ursprünglich als Vermittler von Zelltod in nekrotischen Tumoren entdeckt wurde, gehört als Zytokin zur Gruppe der TNF-Liganden-Familie (Carswell et al., 1975; Wajant, Pfizenmaier, & Scheurich, 2003). TNF kann als trimeres Membranprotein (mTNF) vorliegen oder durch eine Protease (TACE) zu löslichen TNF (sTNF) abgespalten werden (Black et al., 1997). TNF wird als Reaktion auf Pathogene oder unter inflammatorischen Bedingungen hauptsächlich von Makrophagen, T-Zellen und NK-Zellen exprimiert (Yoon & Gores, 2002). Das Zytokin kann dabei als Ligand an zwei-TNF-Rezeptoren binden. TNF-Rezeptor 1 (TNFR1), der in fast allen Geweben exprimiert ist und TNF-Rezeptor 2 (TNFR2), der vorwiegend auf Immun- und Endothelzellen zu finden ist (Brenner, Blaser, & Mak, 2015). Beide Rezeptoren binden dabei mTNF und sTNF, wobei TNFR2 nur durch mTNF vollständig aktiviert werden kann (Grell et al., 1995).

## I. Einleitung

TNF spielt aber nicht nur beim Zelltod eine zentrale Rolle. Durch die Aktivierung von NF $\kappa$ B durch TNF kann über die Transkription von proinflammatorischen und anti-apoptotischen Genen das Überleben von Zellen und Entzündungsreaktionen gesteuert werden (Chan, Luz, & Moriwaki, 2015; Wajant & Scheurich, 2011).

Nach Bindung von TNF an den TNFR1 kommt es zur Bildung von TNFR-Komplex II, der zu einer Aktivierung von Caspase 8 führt (Micheau & Tschopp, 2003). Diese Caspase 8-Aktivierung kann dabei über Komplex IIa und Komplex IIb erfolgen und leitet in weiteren Schritten über eine Caspasen-Kaskade die Apoptose ein (**Abbildung 3**). Neben der Aktivierung von Caspase 8 kann es ebenso durch eine Aktivierung der membranständigen NADPH-Oxidase (NOX) über die Riboflavin-Kinase zu einer Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) kommen (Yazdanpanah et al., 2009). Eine anschließende Aktivierung der Phospholipase C führt zu einer Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>). Diese *Second Messenger* kontrollieren diverse zelluläre Prozesse. IP<sub>3</sub> diffundiert dann durch das Zytosol und bindet an den IP<sub>3</sub>-Rezeptor des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Diese Bindung führt zu einer Freisetzung von Calcium-Ionen (Ca<sub>2+</sub>) aus dem ER (Marchant & Taylor, 1997). Die Aufnahme von freien Ca<sub>2+</sub> in den Mitochondrien führt zu einer mitochondrialen Permeabilitätssteigerung (mPT) und einer anschließenden Cytochrom C Freisetzung mit Aktivierung der Initiator Caspase 9. Die weitere Aktivierung der Effektor Caspase 3 induziert dann die Apoptose (Rasola & Bernardi, 2011; Szalai, Krishnamurthy, & Hajnoczky, 1999).

## I. Einleitung



**Abbildung 3: Caspasen-Aktivierung nach Bindung von TNF an den TNFR1**

Nach der Bindung von TNF (blau) an den TNFR1 kommt es zu einer Aktivierung von Caspase 8. Daneben kann es zu einer Aktivierung der membranständigen NADPH-Oxidase (NOX) über die Riboflavin-Kinase und zu einer Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) kommen. Eine anschließende Aktivierung der Phospholipase C führt zu einer Spaltung von PIP<sub>2</sub> in DAG und IP<sub>3</sub>. IP<sub>3</sub> führt nach Bindung an den IP<sub>3</sub> Rezeptor des ER zu einer Freisetzung von Ca<sub>2+</sub> und zu einer mitochondrialen Permeabilitätssteigerung (mPT) mit anschließender Cytochrom C-Freisetzung und Aktivierung der Initiator Caspase 9.



## 4. Precision-cut Liver Slices – ein vielseitiges *ex vivo* Tool

Generell ist die 3D-Zellkultur, zu der auch die Precision-cut Liver Slices zählen, einer der am schnellsten wachsenden Ansätze und Modelle in den Biowissenschaften (Edmondson, Broglie, Adcock, & Yang, 2014). In den letzten Jahren suchen immer mehr Wissenschaftler nach einer Alternative zur traditionellen Zellkultur. Der Hauptgrund dieser Veränderung liegt darin, dass sich 3D-Kulturen bei der Untersuchung von Zellen als näher an natürlichen *in vivo*-Systemen erwiesen haben. Für die Leber wurden bereits verschiedene 3D-Zellkulturmodelle entwickelt, die die hepatische Mikroarchitektur nachbilden und die Besiedlung mit unterschiedlichen Leberzellen erleichtern. Aus Stammzellen gewonnene Zellen wurde auch verwendet, um menschliches Lebergewebe zu konstruieren (Takebe et al., 2013). Jedoch erfordern diese Ansätze eine aufwändige und kostenintensive Technologie. Ein direkterer Ansatz zur Etablierung von 3D-Kulturen ist die Herstellung von Gewebeschnitten, wie beispielsweise die hier beschriebenen Precision-cut Liver Slices.

### 4.1 Der Weg von manuell hergestellten Leberschnitten hin zu Precision-cut Liver Slices

Bereits in den 1930er Jahren begannen Otto Warburg und H.A. Krebs mit der Herstellung der ersten Generation von Gewebeschnitten (Krebs, 1933; Warburg, 1923). Hans Krebs arbeitete damals als junger Arzt gemeinsam mit Otto Warburg und lernte von ihm aktuelle Techniken kennen – einige ausgefeilte, wie z.B. den Warburg-Apparat und einige ziemlich einfache, wie z.B. die Herstellung von dünnen Scheiben aus frischem Lebergewebe. Diese Leberschnittkulturen wurden damals noch von Hand hergestellt und zeigten folglich eine begrenzte Reproduzierbarkeit und Lebensfähigkeit (Stadie & Riggs, 1944). Nach einem Rückgang der Anwendung von Schnitten zugunsten der Verwendung von isolierten Hepatozyten führte die Entwicklung des Krumdieck-Slicers in den 80er-Jahre zu einem Comeback der Technik und ermöglichte eine Herstellung von dünnen lebensfähigen Schnitten der zweiten Generation (Krumdieck, dos Santos, & Ho, 1980). Damit wurde eine Renaissance der Slice-Technologie ausgelöst. Krumdieck et. al etablierten damals ein handbetriebenes Mikrotom, um Schnitte mit möglichst geringem Gewebetrauma zu produzieren (Krumdieck et al., 1980). Der *Krumdieck Tissue Slicer*

wurde ständig weiterentwickelt und ist heutzutage noch eine gängige Apparatur in der Herstellung von Gewebeschnitten sämtlicher Organe. Daneben kommen vor allem neue Geräte der VT Serie (VT1000S oder VT1200S) von Leica Biosystems zum Einsatz, die mit vibrierender Klinge und Einbettung der Organe in Agarose eine hohe Schnittqualität garantieren und die Herstellung von Precision-cut Liver Slices der dritten Generation ermöglichen. Eine Studie ergab, dass Schnitte, die mit dem Leica VT1200S hergestellt wurden, eine bessere Reproduzierbarkeit hinsichtlich der Schnittdicke im Vergleich zum *Krumdieck Tissue Slicer* zeigten. Ein Unterschied in der Viabilität der Schnitte konnte dabei allerdings nicht gezeigt werden (Zimmermann, Lampe, et al., 2009).

Anfangs wurde die Präzisionsschnitttechnik angewendet um hauptsächlich Leberfunktionen zu untersuchen (Krumdieck et al., 1980). Heutzutage gibt es aber viele Veröffentlichungen die eine Verwendung dieser Technik bei anderen extrahepatischen Geweben einschließlich Darm (de Kanter et al., 2005), Niere (Vittorelli, Gauthier, Michoudet, & Baverel, 2004), Lunge (Moreno et al., 2006), Gehirn (Pai & Ravindranath, 1991), Herz (Bull et al., 2000; Parrish, Gandolfi, & Brendel, 1995), Prostata (Parrish et al., 2002) und Milz (Hoffmann, Skibinski, & James, 1995) zeigen.

### 4.2 Anwendungsbereiche von Precision-cut Liver Slices

Precision-cut Tissue Slices verschiedenster Organe sind zuletzt zunehmend für unzählige Untersuchungen zur Anwendung gekommen. Dabei werden Precision-cut Liver Slices (PCLS) vor allem für die Analyse des Stoffwechsels bei der Anwendung von körperfremden Substanzen (Xenobiotika) und physiologischen Substraten genutzt (Lerche-Langrand & Toutain, 2000; S. Wang et al., 2010). In letzter Zeit haben sich Schnittkulturmodelle bei weitaus mehr Untersuchungen als anwendbar erwiesen, beispielsweise bei Studien zur Transport-vermittelten Arzneimittelaufnahme (Olinga et al., 2001) oder zur Aufnahme und Wirkung von *Drug-Targeting*-Präparaten (Beljaars et al., 2001; Melgert et al., 2000; Proost et al., 2006). Auch die Regulation Arzneimittel-metabolisierender Enzyme und Transporter kann mit PCLS untersucht werden (Khan, Chow, Porte, Pang, & Groothuis, 2009; Khan, Chow, van Loenen-Weemaes, et al., 2009; Khan, Dragt, Porte, & Groothuis, 2010).

## I. Einleitung

Zusätzlich wird die Arzneimittel-induzierte Toxizität mithilfe von PCLS unter Verwendung von funktionellen, biochemischen, histomorphologischen und genomischen Ausleseparametern untersucht. Damit verbunden konnten PCLS zur Vorhersage von Toxizität und zur Entdeckung früher Toxizitätsmarker beitragen (Elferink et al., 2008; Elferink et al., 2004; Hagens et al., 2006; Klassen et al., 2008; Staal et al., 2008; Vickers & Fisher, 2005). Die Toxizität chemischer Stoffe und damit verbundene Veränderungen im genetischen Material (Genotoxizität) werden bei PCLS durch die Anwendung des Comet Assays, einer Methode zu Messung von DNA-Schäden untersucht (Plazar, Filipic, & Groothuis, 2008; Plazar, Hreljac, Pirih, Filipic, & Groothuis, 2007). Mit der Anwendung von Hochdruckflüssigkeitschromatographie–Massenspektrometrie können DNA-Schäden, die durch Oxidation entstehen, untersucht werden (Yue et al., 2007)

Anwendung finden PCLS auch in der Transplantationsforschung und werden dabei zur Optimierung von Methoden zur Kältekonservierung von Spenderorganen eingesetzt. Die Auswirkungen von Hirntod und Ischämie auf die Funktion der Organe nach Reoxygenierung konnten mit PCLS untersucht werden. Dabei wurden Leberschnitte zur Simulation von Zuständen des Transplantats wie beispielsweise während der Organbeschaffung, dem Transport und nach Transplantation genutzt und untersucht (Langdale, Kajikawa, Frevert, & Liggitt, 2003; Lee, Culberson, Korneszczyk, & Clemens, 2008; Olinga et al., 2005; Hart et al., 2005).

Sowohl die Medikamenten-induzierte Toxizität als auch die Reperfusion nach Ischämie sind mehrzellige Prozesse an denen nicht nur Epithelzellen, sondern auch andere Zelltypen, insbesondere Makrophagen und Endothelzellen, beteiligt sind. PCLS bieten ein hervorragendes *ex vivo*-Modell, um diese Prozesse zu untersuchen.

Zusätzlich zu gesundem Lebergewebe werden PCLS auch von krankem Gewebe angefertigt, um im weiteren Verlauf pathologische Prozesse und therapeutische Wirkungen von Arzneimittel zu untersuchen. Bei fibrotischem Lebergewebe konnte die Funktionalität (Guo, Wang, & Zhang, 2007) und die therapeutische Wirksamkeit von *Drug-Targeting*-Präparaten (van de Bovenkamp, Groothuis, Meijer, & Olinga, 2006) untersucht werden. Auch Schnittkulturmodelle von Lebertumoren wurden verwendet, um die Wirksamkeit einer Krebstherapie zu bestimmen (Zimmermann, Armeanu, et al., 2009).

Zusammenfassend sind die Anwendungen der Methode vielfältig und es können mit PCLS die Physiologie, die Wirksamkeit und Toxizität von Arzneimittel sowie Mutagenese und Karzinogenese und andere Veränderung der Leber erforscht werden (Palma, Doornebal, & Chokshi, 2019). Auch PCLS von humaner Leber kommen vermehrt in der Forschung zur Anwendung (Hadi et al., 2013; Laschinger et al., 2020; Westra et al., 2016; Wu et al., 2018).

### 4.3 Vor- und Nachteile in der Anwendung von Precision-cut Liver Slices

Der entscheidende Vorteil von Precision-cut Liver Slices besteht darin, die Reaktion der Hepatozyten in der komplexen dreidimensionalen Leber-Mikroarchitektur zu untersuchen. Durch die erhaltene Gewebearchitektur bleiben dreidimensionale Zell-Zell-Kontakte erhalten sowie residente Zelltypen verfügbar. Viele Leberfunktionen sind stark von Interaktionen mit ihrer natürlichen Matrix abhängig, wie zum Beispiel bei der Immunüberwachung durch virus-spezifische CD8 T Zellen und der Clearance von virusinfizierten Zellen (Knolle & Gerken, 2000). Die Multizellularität und intakte Zellmatrix sind auch zur Untersuchung von Toxizität ein offensichtlicher Vorteil, da viele toxikologische Prozesse mehrzellig ablaufen oder abhängig von der interzellulären Kommunikation sind (Graaf, Groothuis, & Olinga, 2007).

Bei der Arbeit mit Schnittkulturmodellen der Leber gibt es auch Limitationen. Auch wenn Precision-cut Liver Slices unter optimalen Bedingungen bis zu 5 Tagen kultiviert werden können (Vickers et al., 2004), reicht diese Zeit nicht aus, um chronische Toxizität von Noxen zu untersuchen. Im Gegensatz dazu konnte Lebergewebe mithilfe der 3D-Scaffold-Technik, bei der Hepatozyten einen Scaffold aus dreidimensionaler extrazellulärer Matrix besiedeln, bereits 5 Monate kultiviert werden (Ng et al., 2017). Ein weiterer Nachteil der Methode ist, dass die Vorbereitungen, die Durchführung und Inkubation sehr arbeits- und platzintensiv sind und vor allem bei Studien, die das Ziel einer hohen Durchsatzrate verfolgen, problematisch werden könnten.

Ebenso diskutiert wird eine Abnahme der P450-Expression bei längerer Kultivierung von PCLS (Graaf et al., 2007). In den meisten PCLS-Modellen erfolgt der Stofftransport durch Diffusion. Dadurch kann es passieren, dass Sauerstoff und Nährstoffe, abhängig von der Schnittdicke, innere Zellschichten des Schnittes nicht erreichen können und folglich innere Zellschichten nekrotisch werden (de Graaf et al., 2010). Daher werden

Schnittkulturmodelle mit zusätzlicher Perfusion als nächste Generation der Zellkulturen gehandelt und sind neben den Bestrebungen der wissenschaftlichen Institute auch von den technischen Entwicklungen der Industrie abhängig (Li & Cui, 2014). Precision-cut liver slices in speziellen Perfusionsplatten und einer Pumpe zu perfundieren konnte im Rahmen der Dissertation in Nebenarbeiten positiv evaluiert werden. Ein weiterer Nachteil von PCLS ist, dass Zellen im Inneren weniger exponiert sind als Zellen am Rand. Dies kann zu einer unvollständigen Penetration von chemischen Verbindungen führen, da vor allem bei schnell verstoffwechselbaren lipophilen Substanzen die äußeren Zellschichten diese Substanzen schnell aufnehmen und somit eine abnehmende Exposition gegenüber inneren Zellschichten entstehen kann (Worboys, Bradbury, & Houston, 1997). Im Gegensatz dazu konnte aber auch gezeigt werden, dass unter optimalen Inkubationsverhältnissen die inneren Zellschichten ausreichend mit den zur Verfügung gestellten metabolisierenden Substanzen gesättigt werden (de Graaf et al., 2006). Somit ist die Penetration der Substanzen abhängig von der Schnittdicke und dieses Problem kann durch die Verwendung dünnerer Schnitte umgangen werden.

#### 4.4 Precision-cut Liver Slices als Möglichkeit zur Reduktion von Versuchstieren

Ein weiterer wichtiger Vorteil von PCLS ist die Reduktion von Versuchstieren in Experimenten. Allein im Jahr 2018 wurden laut Veröffentlichung des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz rund 2,8 Millionen Tiere für wissenschaftliche Zwecke eingesetzt. Rund 72% der Tiere sind Mäuse ([www.bmel.de](http://www.bmel.de)). In der Gesamtzahl sind auch Tiere berücksichtigt, bei denen lediglich Blut abgenommen wurde.

Die *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) sowie die deutsche Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS) empfehlen die Anwendung der „3 R“-Prinzipien im Umgang mit Tierversuchen. Die „3 R“-Prinzipien wurden 1959 erstmals von Russel und Burch beschrieben. Dabei wird ein vollständiger Verzicht von Tierexperimenten (Replacement) diskutiert oder, falls nicht möglich, eine Reduktion der Anzahl von eingesetzten Tieren (Reduction) bzw. eine Minderung der Belastung während den Experimenten (Refinement) (Russell W.M.S., 1959). Zur Durchsetzung dieser Prinzipien wurde in Deutschland die *Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch* (ZEBET) am

## I. Einleitung

Bundesinstitut für Risikobewertung gegründet. Unter dem Gesichtspunkt, dass aus einer Mausleber mehrere Schnitte angefertigt werden können und dadurch mehrere Substanzen an einem Tier getestet werden können, stellen Precision-cut Liver Slices (PCLS) eine gute Methode zur Reduktion von Tierversuchen dar. Ebenso können Substanzen getestet werden, die für eine Anwendung *in vivo* eine zu starke Belastung für den Organismus des Tieres darstellen würden.

## II. Ziele der Arbeit

Das Ziel der Arbeit bestand darin, ein eigenes Testsystem zur Untersuchung der Immunüberwachung bei viralen Infektionen der Leber zu etablieren. Es ist bekannt, dass multizelluläre Leberfunktionen stark von Interaktionen mit ihrer natürlichen Matrix abhängig sind und ein komplexes Zusammenspiel von Zell-Zell-Kommunikation für die Immunüberwachung durch virus-spezifische CD8 T Zellen und die Clearance von virusinfizierten Zellen notwendig ist (Knolle & Gerken, 2000). Der Anspruch bestand darin, ein vereinfachtes *ex vivo* System zu etablieren, das genau dieses Zusammenspiel einer komplexen Zell-Zell-Kommunikation gewährleisten kann. Dabei sollte die Mikroarchitektur der Leber, das physiologische Milieu, Zell-Zell-Kontakte sowie ortsständige Zellen erhalten bleiben und möglichst einem *in vivo*-System gleichen. Mit der Anwendung von Precision-cut liver Slices (PCLS) können genau diese Anforderungen erfüllt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte dann mit dem etablierten System im Rahmen der neuen zytotoxischen CTL-Effektorfunktion gegen virale Infektionen der Leber (Wohlleber et al., 2012) folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Induziert TNF Apoptose in virusinfizierten Precision-cut Liver Slices?
- Führen Inhibitoren des NOX – Signalweges zu verminderter Apoptose in virusinfizierten Precision-cut Liver Slices nach TNF-Gabe?
- Welche Rolle spielt ROS in der nicht-kanonischen zytotoxischen Effektorfunktion?
- Gibt es Unterschiede in der bioenergetischen Aktivität von nicht infizierten und virusinfizierten PCLS?

Hinsichtlich der Anwendbarkeit des Systems sollten zusätzlich folgenden Fragestellungen beantwortet werden:

- Können PCLS aus transgenen Mäusen zu Fragestellungen zur Leberregeneration herangezogen werden?
- Können die etablierten SOP's zur Herstellung von murinen PCLS auf ein humanes Setting übertragen werden?
- Kann ein bioenergetisches Monitoring durch hochauflösende Respirometrie von murinen PCLS durchgeführt werden?

## III. Material und Methoden

### 1. Material

#### 1.1 Geräte

Dehydrierung	ASP300S (Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland)
Färbeautomat	Bondmax Rx <sub>m</sub> (Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland)
Feinwaage	Analysenwaage ABS (Kern&Sohn, Balingen-Frommern, Deutschland)
Inkubator	Heracell™ 150 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
In-vivo-Imaging-System	IVIS® Lumina LT Series III (PerkinElmer LAS, Germany)
Mikrotiterplatten – Lesegerät	Tecan Infinite M 1000 Pro (Tecan, Männedorf, Schweiz)
Mini-Shaker für Inkubator	3D Multi Bio Shaker (BioSan, Riga, Latvia)
Objektträger-Scanner	Aperio AT2 (Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland)
O2k Respirator	Oroboros Oxygraph- 2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich)
pH-Meter	inoLab® pH 7110 (WTW Weilheim, Deutschland)
Pipetten	Eppendorf Research Plus (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Präparationsbesteck	Fine Science Tools (Heidelberg, Deutschland)
Sterilwerkbank	Heraeus® HERA Safe® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
Trans-Blot-System	Trans-Blot Turbo™ (Bio Rad Laboratories, München, Deutschland)



### III. Material und Methoden

Vibratom	VT 1000S (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland)
Wasserbad	Schüttelwasserbad (GFL, Burgwedel, Deutschland)
Western-Blot-Imaging System	ChemiDoc™ MP (Bio Rad Laboratories, München, Deutschland)
Zentrifugen	Heraeus® Fresco 17 Heraeus® Multifuge X3R (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

#### 1.2 Verbrauchsmaterialien

Agarose	Low Melting Agarose (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Kanülen	0,4x20 mm 27G, 0,6x25 mm 23G, 0,8x120mm 21G Sterican® (B. Braun, Melsungen, Deutschland)
Metallring	
Mikrotiterplatten	Corning® 96 well plate white (Corning Inc., Corning, NY, USA) TPP® 12-well plate, 96-well plate (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz)
Petrischalen	10cm Greiner (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland)
Pellet Pestle™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Pipettenspitzen	Standardtips 10µl, 100µl, 1000µl (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland)
Reaktionsgefäße	1,5ml (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Skalpelle	Feather (Osaka, Japan)

### III. Material und Methoden

Spritzen	Injekt® (B. Braun, Melsungen, Deutschland)
Superkleber	UHU® (Bühl, Deutschland)
Vortex-Mischer	Corning® LSE™ (Corning Inc., Corning, NY, USA)
Western-Blot-Gel	Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ (Bio Rad Laboratories, München, Deutschland)
Western-Blot-Membran	Midi-PVDF TransBlot® Turbo™ Transfer-Pack (Bio Rad Laboratories, München, Deutschland)

#### 1.3 Kit-Systeme

Caspase-Glo® 3/7 Assay	Promega, Madison, WI, USA
CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay	Promega, Madison, WI, USA
CytoTox-ONE™ Homogenous Membrane Integrity Assay	Promega, Madison, WI, USA
DC™ Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland

### III. Material und Methoden

#### 1.4. Chemikalien und Reagenzien

0,9 % NaCl Kochsalzlösung, isotonisch	Deltamedica, Reutlingen, Deutschland
ADP	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Antimycin A	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Aprotinin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
CCCP	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Cyclosporin A	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Cytochrom C	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
DMSO	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Edelfosine	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
HCl	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Heparin	Heparin-Natrium 25000 I.E./5ml (Ratiopharm, Ulm, Deutschland)
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isofluran CP®	CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland
Leupeptin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Oligomycin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Organkonservierungslösung	<i>Custodio</i> ® Franz Köhler Chemie, Bensheim, Deutschland
Pefablock	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ponceau S	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Q-VD-OPh	Biomol, Hamburg, Deutschland
Rotenon	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
SDS	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Succinat	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween 20	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

### III. Material und Methoden

Williams Medium  
mit L-Glutamine  
und 2.24 g/L NaHCO<sub>3</sub>

PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

#### 1.5 Puffer und Medien

HEK-293 Medium

DMEM mit Glucose

10 % FCS

2 mM Glutamin

100 U/ml Penicillin/0,1 mg/ml Streptomycin

Trypsin – EDTA – Lösung

Hypotonischer Extraktionspuffer

25 mM HEPES pH 7,5

5 mM MgCl

1 mM EGTA

1 mM Pefablock

1 µg/ml Aprotinin

1 µg/ml Leupeptin

PBS (Fa. Biochrom) pH 7,4

80 g/l NaCl

0,2 g/l KCl

1,44 g/l NaHPO<sub>4</sub>\*2 H<sub>2</sub>O

0,2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

### III. Material und Methoden

Primäres Hepatozyten Medium	600 µl	L-Glutamin (200mM)
	11,5 ml	HEPES 1M pH 7,4
	2.8 ml	Pen-Strep 10000U/ml
	1 ml	Gentamycin 50mg/ml
	1,25 ml	Hydrocortison
	0,32 ml	Insulin
	8,7 ml	DMSO (100%)
	pro 500 ml Williams Medium E	
Ponceau S-Lösung	0,1 % Ponceau S	
	5 % Essigsäure	
SDS Laufpuffer	25 mM Tris	
	192 mM Glycin	
	0,1 % SDS	
TBST	20 mM Tris	
	137 mM NaCl	
	pH 7,6 (mit HCl)	
	0,1 % (v/v) Tween 20 (frisch dazugegeben)	

### III. Material und Methoden

#### 1.6 Mausmodell und Tierhaltung

C57BL/6J Mäuse wurden von Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) bezogen. Für die Experimente wurden männliche Mäuse zwischen 6 und 8 Wochen verwendet. Die Tiere wurden dafür unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPF) und nach den Richtlinien der *Federation of Laboratory Animal Science Association* (FELASA) gehalten.

#### 1.7 Rekombinante Adenoviren

<b>Adenovirus</b>	<b>Express</b>
Ad-GFP	CMV-Promoter; eGFP

#### 1.8 Computersoftware

<b>Software</b>	<b>Firma</b>
Affinity Designer	Serif, Nottingham, UK
Bio Render	BioRender.com
Endnote X9.1.1	Clarivate Analytics, Philadelphia, USA
Illustrator CS5	Adobe, San José, California, USA
Image Lab, Version 5.2	Bio Rad Laboratories, München, Deutschland
Living Image 4.3.1	Caliper LS, Hopkinton, Massachusetts, USA
Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Microsoft Powerpoint 2016	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Microsoft Word 2016	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Oroboros DatLab V6.1	Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich
Prism 5	GraphPad Software, San Diego, California, USA

### III. Material und Methoden

#### 1.9 Antikörper

Western Blot – Primärantikörper:

<b>Antigen</b>	<b>Klon</b>	<b>Nummer/Lot</b>	<b>Verd.</b>	<b>Hersteller</b>
Caspase 3	polyklonal	9662/15 od. 16	1000	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Caspase 3 (gespalten)	polyklonal	9661	1000	Cell Signaling Technology, Frankfurt
GAPDH	D16H11	5174/6	1000	Cell Signaling Technology, Frankfurt

Western Blot – Sekundärantikörper:

<b>Antigen</b>	<b>Klon</b>	<b>Nummer/Lot</b>	<b>Verd.</b>	<b>Hersteller</b>
Kanninchen (leichte Kette)	5A6-1D10	211-032-171/ 130846	20.000	Jackson Immuno Research Cambridgeshire, UK
Maus (leichte Kette)	Polyklonal	115-035-174/ 129518	20.000	Jackson Immuno Research Cambridgeshire, UK

Immunhistochemie – Antikörper:

<b>Antigen</b>	<b>Klon</b>	<b>Nummer/Lot</b>	<b>Verd.</b>	<b>Hersteller</b>
Caspase 3 (gespalten)	polyklonal	9661	200	Cell Signaling Technology, Frankfurt

### III. Material und Methoden

#### 1.10 Rekombinante Proteine

<b>Protein</b>	<b>Nummer</b>	<b>Hersteller</b>
mTNF (rekombinantes murines TNF)	PMC3013	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

#### 1.11 Mauslinie

<b>Linie</b>	<b>Herkunft</b>
C57BL/6J (Wildtyp, Inzuchtstamm)	Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich), oder aus der eigenen Maushaltung des Instituts für molekulare Immunologie der TU München

#### 1.12 Zelllinie

<b>Linie</b>	<b>Herkunft</b>
HEK-293 (ATCC® CRL-1573™)	ATCC, Manassas, Virginia, USA



## 2. Methoden

### 2.1 Virale Infektion

Die virale Infektion der Mäuse erfolgte intravenös über die Schwanzvene. Dabei wurden Adenoviren in einem Volumen von 100 µl in 0,9% NaCl in einer Dosis von  $5 \times 10^8$  pro Maus verabreicht. Eine Sicherstellung der Infektion erfolgte durch eine tägliche Gewichtsmessung und einer *in vivo* Biofluoreszenzmessung.

### 2.2 *In vivo* und *ex vivo* Biofluoreszenzmessung

48 Stunden nach Infektion der Mäuse erfolgte eine *in vivo* Biofluoreszenzmessung für die Sicherstellung der Infektion. Dazu wurde eine Inhalationsanästhesie mit 2,5% Isofluran durchgeführt. Die Messung erfolgte mit einem IVIS® Lumina LT Series III von PerkinElmer LAS. Die Messdaten wurden mit einer Living Image Software ausgewertet. Für die Messung der Infektion nach Herstellung der Leberschnitte wurden die PCLS in eine 12-well Mikrotiterplatte mit PBS gelegt und erneut gemessen.

### 2.3 Organentnahme

Vor Beginn der Organentnahme erfolgte eine Vollheparinisierung der Maus i.p. mit 10000 I.E./5ml Heparin gelöst in 150 µl NaCl. Die Tötung der Mäuse erfolgte durch eine zervikale Dislokation unter Inhalationsanästhesie mit 2,5% Isofluran. Nach sachgemäßer Eröffnung der Bauchdecke wurde die Leber frei präpariert und entnommen. Es folgte eine sofortige Lagerung der Leber in Custodiol® in einer Petrischale auf Eis.

### 2.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Um eine gleichmäßige Proteinmenge und somit vergleichbare Daten aus den Leberschnitten zu generieren, wurde die Proteinmenge der Schnitte mithilfe des DC™ Protein Assays von Bio-Rad Laboratories bestimmt. Dabei wurden die gefrorenen Leberschnitte, die in einem 1,5 ml Eppendorf aufbewahrt wurden, aufgetaut und mithilfe von 50 µl HEB Puffer und eines *Pellet Pestles* lysiert. Nach einer Zugabe von weiteren 100 µl HEB Puffer wurden die Proben mit dem Vortex-Mischer

### III. Material und Methoden

sekundenweise geschüttelt. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand für weitere Analysen und somit auch für die Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet. Zur Analyse der Proteinkonzentration wurden 5 µl des Überstandes als Triplikate in eine durchsichtige 96-well Mikrotiterplatte pipettiert und nach Angaben des Herstellers aufbereitet. Die Messung der optischen Dichte bei 750 nm erfolgte mit dem Tecan Infinite M 1000 Pro. Die Konzentrationen wurden mithilfe der Standardkurve mit Excel berechnet. Für die Standardkurve wurde Rinderserumalbumin in HEB Puffer in den Konzentrationen von 0,25 mg/ml bis zu 2 mg/ml gelöst.

#### 2.5 Bestimmung der Caspasen-Aktivität

Die Bestimmung der Caspase 3 Aktivität erfolgte mithilfe des Caspase-Glo® 3/7 Assays von Promega basierend auf den zuvor bestimmten Proteinkonzentrationen der Proben. Die Proben wurden dazu 1:100 mit HEB Puffer verdünnt. Anschließend wurden 30 µl Probenmaterial und 30 µl Caspase-Glo® in einer weißen Corning® 96-well Mikrotiterplatte gemixt. Um Blasen, die eine Messung stören könnten zu entfernen, wurde die Mikrotiterplatte für wenige Sekunden zentrifugiert. Anschließend wurde die Caspasen-Aktivität nach Angaben des Herstellers durch Messung der Lumineszenz während einer 90-minütigen Inkubation bei RT mit dem Tecan Infinite M 1000 Pro gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Excel und Prism.

#### 2.6 Bestimmung von LDH

Die Bestimmung der LDH wurde mithilfe des CytoTox-ONE™ Homogenous Membrane Integrity Assays durchgeführt. Dabei wurde das Inkubationsmedium zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und das von den Leberschnitten in das Medium freigesetzte LDH bestimmt. 50 µl Inkubationsmedium und 50 µl CytoToxONE™ Reagent wurden in einer weißen Corning® 96-well Mikrotiterplatte gemixt und für 10 Minuten bei RT stehen gelassen. Anschließend wurde die dazugehörige *Stop Solution* dazugegeben und die Absorption bei einer Anregungswellenlänge von 560 nm und der Emission von 590 nm mit dem Tecan Infinite M 1000 Pro gemessen. Das Inkubationsmedium, das für die Analyse

### III. Material und Methoden

entnommen wurde, kann bei – 20 °C bis zur weiteren Analyse gefroren werden. Ebenso wurde das entnommene Inkubationsmedium anschließend sofort durch frisches Inkubationsmedium ersetzt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Excel.

#### 2.7 Histologie

Die histologische Untersuchung der Precision-cut Liver Slices wurde in Kooperation mit dem Institut für Pathologie der Technischen Universität München unter der Leitung von PD Dr. Katja Steiger und der Hilfe von Anne Jacob durchgeführt. Dabei wurden die angefertigten Leberschnitte für 48 Stunden in 4% Paraformaldehyd fixiert, anschließend dehydriert und in Paraffin eingebettet. Danach wurden 2 µm dünne Schnitte angefertigt und für den Färbeprozess entparaffiniert. Die Schnitte wurden für eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) oder immunhistologische Färbung mittels Primär-Antikörper gegen gespaltene Caspase 3 verwendet und mit einem BondMax Rxm von Leica Biosystems durchgeführt. Die Digitalisierung der Objektträger erfolgte mit einem Scanner ebenfalls von Leica Biosystems.

#### 2.8 Statistik

Die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde mit der GraphPad Prism Software durch den Student's T-Test durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  markiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (Mean) mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt.

#### 2.9 Bestimmung von ATP

Um die metabolische Aktivität der Leberschnitte zu überprüfen, wurde eine Messung von ATP mithilfe des CellTiter-Glo<sup>®</sup> 3D Cell Viability Assays durchgeführt. Dieser Assay wurde speziell für den Einsatz in 3D-Zellkulturmodellen entwickelt und ist direkt proportional zu der Anzahl der metabolisch aktiven Zellen. Nach den verschiedenen Inkubationszeiten, zu denen eine ATP-Bestimmung erfolgte, wurden die Leberschnitte in eine weiße Corning<sup>®</sup> 96-well Mikrotiterplatte gelegt. Anschließend wurden 100 µl CellTiter-Glo<sup>®</sup> 3D Reagent pro well dazugegeben. Die Platte wurde danach für 25 Minuten auf eine Schüttelplattform gestellt und vor Licht geschützt. Danach wurde die

Lumineszenz mit dem Tecan Infinite M 1000 Pro gemessen. Anschließend erfolgte eine Bestimmung der Proteinkonzentration der Schnitte. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Excel.

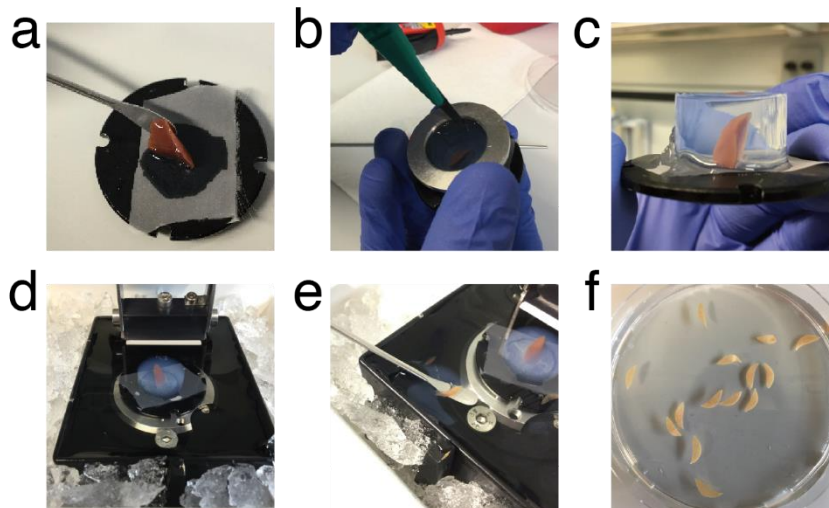
#### 2.10 Herstellung muriner Precision-cut Liver Slices

Die Herausforderung bei der Herstellung von Precision-cut Liver Slices bestand darin, das weich-elastische Gewebe der Leber so vorzubereiten, dass es für den Schneidevorgang mit dem Vibratom ausreichend stabilisiert und fixiert ist. Als Lösung dafür wurde eine äußere Einbettung von Lebergewebe in eine spezielle Agarose durchgeführt, die das Gewebe während des Schneidevorganges in Position hält. Neben einer ausreichenden Kühlung von Gewebe tragen sorgfältige Vorbereitungen der Abläufe zu einer gewebeschonenden Herstellung von PCLS bei.

Im Detail erfolgte die Herstellung von 300 µm dicken Precision-cut Liver Slices (PCLS) nach sachgemäßer Entnahme der Leber mit dem Vibratom Leica VT 1000S von Leica Biosystems. Die einzelnen Schritte wurden in einer Abbildung visualisiert (**Abbildung 4**). Ein einzelner Leberlappen wurde dabei mit einem Superkleber auf den Probenteller des Vibratoms geklebt, nachdem zuvor ein ca. 2x1 cm großes Vlies zwischen Leber und Probenteller gelegt wurde. Vor dem Aufkleben des Leberlappens empfiehlt es sich, den Leberlappen auf ein Papiertuch zu legen, um überschüssige Organkonservierungslösung (Custodiol®) abtropfen zu lassen. Anschließend wurde ein Metallring auf die Platte aufgesetzt und dieser mit 4%iger Agarose ausgefüllt (**Abbildung 4b**). Für die 4%ige Agarose wurden zuvor 2 g Agarose in 50 ml PBS in einem 50 ml Falcon-Gefäß gelöst und erhitzt. Die vorbereitete Agarose kann dann im Kühlschrank bei 4 °C für mehrere Tage aufbewahrt und immer wieder für Versuche verflüssigt und erhitzt werden. Dazu wurde die Agarose im Falcon direkt in der Mikrowelle bei 270 Watt und 100 Grad Celsius erwärmt. Um einen Gewebeschaden durch zu hohe Temperaturen der Agarose zu verhindern, wurde auf eine *low melting/low gelling* Agarose zurückgegriffen. Der Vorteil bei der Anwendung dieser speziellen Agarose besteht darin, dass einerseits der Schmelzpunkt gegenüber einer herkömmlichen Agarose weitaus niedriger ist und somit die Herstellung erleichtert wird, andererseits aber auch die Temperatur bei der die Agarose aushärtet niedriger ist. Je nach Herstellerangaben und Konzentration der Agarose erfolgt eine Aushärtung

bei rund 26 – 30 °C. Durch diese geringe Temperatur konnte eine Schädigung von Lebergewebe durch die Agarose bzw. eine Denaturierung von Proteinen nahezu ausgeschlossen werden. Damit die Agarose nach dem Erhitzen in der Mikrowelle flüssig gehalten wird, wurde das Falcon mit der Agarose in ein 41 °C warmes Wasserbad gestellt und leicht geschüttelt, um die Agarose für die anschließenden Versuche flüssig zu halten. Für ein schnelleres und damit gewebeschonenderes Aushärten der Agarose wurde der Probenhalter auf Eis gestellt. Die Einbettung des Leberlappens in Agarose ist ausreichend stabilisierend für den Schneidprozess und macht somit eine zusätzliche Perfusion der Leber mit Agarose, wie beispielsweise bei Precision-cut Lung Slices, nicht notwendig.

Nach Aushärtung der 4%igen Agarose wurde mit Hilfe eines Skalpellens der Metallring von der Agarose gelöst und anschließend Organschnitte mit einer Dicke von 300 µm hergestellt. Dazu wurde der Probenhalter in der Schneidwanne fixiert und so ausgerichtet, dass das Schneiden der Probe in Längsrichtung stattfindet (**Abbildung 4d**). Beim anschließenden Schneidvorgang empfiehlt es sich, die Klingenvorschubgeschwindigkeit des Gerätes möglichst langsam zu wählen, um ein sichereres Schneiden zu gewährleisten ohne das Gewebe zu „drücken“. Umgekehrt kann die Vibrationsfrequenz möglichst hoch gewählt werden und sollte in einem 80%igen Bereich der Maximalfrequenz liegen. Als Schneidpuffer wurde Custodiol® verwendet. In der Organkonservierung und dabei vor allem in der Transplantationsmedizin ist die Verwendung von Custodiol® heutzutage Standard (Kniepeiss et al., 2020). Die Schnitte wurden gesammelt und in einer mit Custodiol® gefüllten Petrischale gesammelt und auf Eis gestellt. Während der Herstellung der Leberschnitte wurde durchgehend auf eine ausreichende Kühlung der Leber und der Schnitte geachtet. Der Schneidpuffer, die Schneidwanne und der Probenhalter wurden vor der jeweiligen Herstellung der Schnitte im Kühlschrank auf eine Temperatur von 4 °C heruntergekühlt. Zusätzlich wurde die Schneidwanne in dem dafür vorgesehenen Bereich mit Eis umgeben, um eine weitere Kühlung des Schneidpuffers während der Herstellung sicherzustellen. Die Leberschnitte wurden bis zur Inkubation konstant auf Eis gestellt und in Custodiol® aufbewahrt. Um einen möglichen Gewebeschaden weiterhin gering zu halten wurde ständig ein Spatel für den Transfer von Gewebe verwendet (**Abbildung 4a, e**).



**Abbildung 4: Schritte zur Herstellung muriner Precision-cut Liver Slices**

(a) Ein Leberlappen wird mit Unterstützung eines Spatels auf den Schneideteller geklebt. (b) Nach Aushärten der 4%igen Agarose wird mithilfe eines Skalpell der Metallring von der Agarose getrennt und die Probe ist für den darauffolgenden Schneidevorgang bereit (c). Schneidevorgang mit dem Vibratom VT Leica 1000S (d, e). Als Schneidepuffer wird eiskaltes Custodiol® verwendet. (f) 300 µm dicke PCLS gesammelt in einer Petrischale mit Custodiol® zum Schutz vor Gewebeschaden. (a-f) Die Abbildung entstand aus eigenen Bildaufnahmen.

#### 2.11 Inkubation muriner Precision-cut Liver Slices

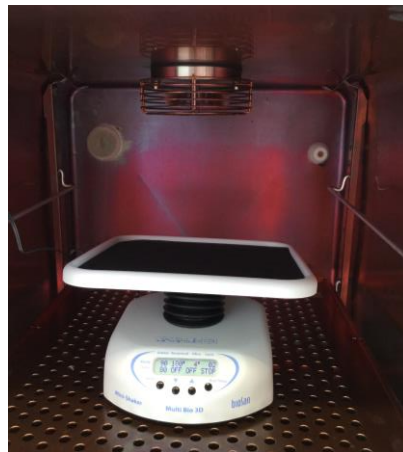
Zur Inkubation von PCLS werden in der Literatur unterschiedliche Systeme beschrieben. Am meisten verbreitet ist die Inkubation in 6-well oder 12-well Mikrotiterplatten (Olinga et al., 1997). Daneben besteht noch die Möglichkeit einer Inkubation in einem dynamischen Organkultur System (DOC) (Brendel, 1993; Smith, 1986) oder mithilfe von *Netwells* (Leeman, van de Gevel, & Rutten, 1995).

Für die anschließende Inkubation im hier beschriebenen System wurden die Leberschnitte in eine durchsichtige 12-well Mikrotiterplatte transferiert. Als Inkubationsmedium wurden pro well 1,4 ml Williams Medium mit L-Glutamine und 2,24g/L NaHCO<sub>3</sub> von PAN-Biotech dazugegeben. Das Medium und die Platte wurden vor Beginn des Experiments bereits in den Inkubator gestellt, um eine warmes und oxygeniertes Medium von Beginn an zu gewährleisten. Die Leberschnitte wurden so schnell und vorsichtig wie möglich in den Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> transferiert. Während des Transfers der Schnitte empfiehlt es sich den Boden der Mikrotiterplatte

### III. Material und Methoden

mit Papiertüchern gegenüber der kühlen Bodenplatte der Sterilwerkbank zu isolieren, um ein schnelles Auskühlen des zuvor erwärmten Mediums zu verhindern. Während der Inkubation wurden die Schnitte auf einer programmierbaren Schüttelplatte in orbitaler Richtung 80-mal pro Minute geschüttelt (**Abbildung 5**). Dabei wurde auf eine Schüttelplatte zurückgegriffen (3D Multi Bio Shaker von BioSan), die uneingeschränkt im Inkubator positioniert und angewendet werden kann. Diese Anwendung hat geholfen, aufwendige platzintensive Installationen und Setups von Inkubationskabinen wie in anderen Arbeiten beschrieben (de Graaf et al., 2010) zu umgehen, und ein effizientes und einfaches Inkubationsverfahren von PCLS zu gestalten.

Nach der Inkubation wurde jeder Leberschnitt separat in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Schnitte wurden in einem - 80 °C Kühlschrank aufbewahrt.



**Abbildung 5: Direkte Positionierung einer Schüttelplatte im Inkubator zur Vermeidung aufwendiger Installation von Inkubationssystemen**

Die Abbildung zeigt eine programmierbare Schüttelplatte (3D Multi Bio Shaker von BioSan). Auf die Schüttelplatte wurde die 12-well Mikrotiterplatte gestellt und in orbitaler Richtung rund 80-mal pro Minute geschüttelt. Das vorsichtige Schütteln der Leberschnitte während der Inkubation hilft, einerseits eine gleichmäßige Verteilung der Stimulatoren und Inhibitoren zu erzielen und andererseits abgestorbene Zellfragmente zu entfernen. Die Abbildung entstand aus eigenen Bildaufnahmen.

#### 2.12 Erstellung von Bioenergetischen Profilen mithilfe eines O<sub>2</sub>k Respirators

Die Analyse der mitochondrialen Atmung in Echtzeit kann nicht invasiv mithilfe eines Flux-Analysators durchgeführt werden. Der Anspruch dabei war es, PCLS nicht permeabilisieren zu müssen oder Mitochondrien aus den Schnitten zu isolieren, wie es beispielsweise bei der Anwendung eines hochmodernen *Seahorse Extracellular Flux Analyzers* notwendig gewesen wäre. Das Ziel war es, eine direkte Messung der oxidativen Phosphorylierung von PCLS nach Herstellung oder Inkubation durchzuführen, ohne dabei durch eine Gewebekomogenisierung die äußere Mitochondrienmembran zu verletzen und damit die mitochondriale Funktion zu beeinträchtigen. Technisch konnte diese Herausforderung durch die Verwendung des O<sub>2</sub>k Respirators von Oroboros Instruments aus Innsbruck gelöst werden. Die Atmungsmessung mit diesem Zwei-Kammer-Titrations-Injektionsrespirometers erfolgte nach der Hinzugabe von PCLS in die dafür vorgesehenen Kammern und deren luftdichten Verschluss. Anschließend wird mit polarographischen Sauerstoffsensoren die Sauerstoffkonzentration in den Messkammern gemessen.

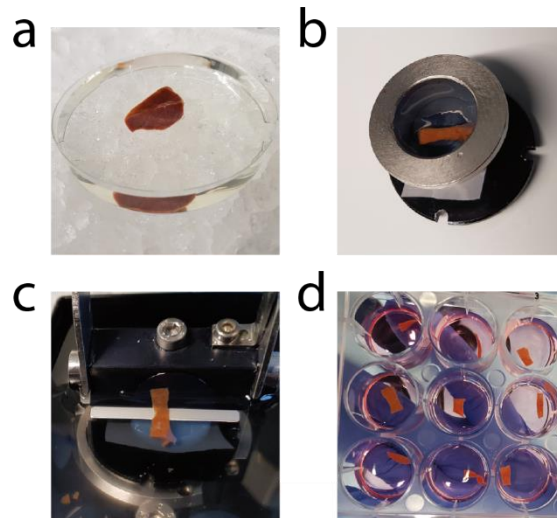
Die hochauflösende Respirometrie von nicht infizierten und virusinfizierten Leberschnitten wurde unter Verwendung spezifischer SUI-Protokolle (Substrate-Uncoupler-Inhibitor-Titration) durchgeführt und die zelluläre und mitochondriale Funktion der Atmung über eine Messung der Sauerstoffkonzentration und des Sauerstoffflusses in Echtzeit dargestellt. Dabei wurden Daten über ausgewählte biochemische Wege, insbesondere über den Prozess der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) in Mitochondrien, generiert. Nach der zuvor beschriebenen Herstellung von Organkulturschnitten der Leber (*siehe 2.10 Herstellung muriner Precision-cut Liver Slices*) wurden diese mit dem O<sub>2</sub>k-Respirometer analysiert. Dabei wurden nach Kalibrierung des Gerätes nach den Angaben des Herstellers, die beiden Kammern des Gerätes jeweils mit gesunden als auch mit virusinfizierten Leberschnitten befüllt. Anschließend wurden bioenergetische Profile gesunder und virusinfizierter Leber hinsichtlich der oxidativen Phosphorylierung verglichen. Die SUI-Protokolle sahen folgenden Schritte vor: Nach Zugabe von Leberschnitten in die Kammer wurden 10 mM Succinat und 0,5 mM Rotenon dazugegeben, um den Komplex I der Atmungskette zu hemmen und zusammen mit Succinat den Elektronenfluss durch den Komplex II zu unterstützen. Anschließend wurden die Atmung der Leberschnitte mithilfe von 2,5 mM ADP forciert. Weiters folgte die Zugabe 10 mM Cytochrom C als



Qualitätskontrolle, um Nebeneffekte einer Cytochrom C-Freisetzung aus geschädigten Zellen von OXPHOS-Defekten unterscheiden zu können. Der nächste Schritt des Protokolls beschreibt die Hemmung des Phosphorylierungssystems durch 5 mM Oligomycin. Um die maximale Atemarbeit der Leberschnitte zu stimulieren, wurde das Protonophor Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP) in Schritten von 1 mM titriert und schließlich das Experiment mit der Hemmung der oxidativen Phosphorylierung durch die Zugabe von 5 mM Antimycin A beendet.

#### 2.13 Herstellung humaner Precision-cut Liver Slices

Humane Leberproben wurden mit Einverständnis der Chirurgischen Klinik der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München entnommen. Die Versuche wurden von der Ethikkommission der Technischen Universität München genehmigt (Ethikvotum: 86/17S). Die Forschung unter Verwendung von menschlichen Lebergewebe wurde gemäß den Vorschriften der Ethikkommission und den ethischen Richtlinien der Deklaration von Helsinki der World Medical Association (WMA) durchgeführt. Die schriftliche Zustimmung wurde von jedem Patienten eingeholt. Die Leberproben (keilförmig, ca. 3,5 x 2 x 1,5 cm) wurden bei onkologischen Leberresektionen im Rahmen der Entfernung von Lebermetastasen bei Mammakarzinom sowie bei kolorektalen Karzinom und bei der Operation eines cholangiozellulären Karzinoms entnommen. Die Proben wurden direkt nach chirurgischer Entnahme in einem mit Custodiol® gefüllten 50 ml Falcon™ auf Eis gelagert und innerhalb von 30 Minuten ins Labor gebracht. Für die Herstellung humaner Leberschnitte wurden die Standard Operating Procedures (SOPs) zur Herstellung muriner Precision-cut Liver Slices direkt auf ein humanes Setting übertragen. Zusammenfassend wurde nach Präparation der Leberprobe mit einem Skalpell, ein Leberstück mit einem Superkleber auf den Probenteller des Vibratoms geklebt, der Metallring aufgesetzt und mit 4%iger Agarose ausgefüllt. Anschließend wurden mit dem Vibratom Leica VT 1000S von Leica Biosystems Schnitte mit einer Dicke von 300 µm hergestellt. Die Schritte zur Herstellung humaner Precision-cut Liver Slices sind somit ident der Herstellung muriner Schnitte (**Abbildung 6**).



**Abbildung 6: Herstellung humaner Precision-cut Liver Slices**

(a) Humane Leberproben werden nach der Entnahme im Operationssaal in Custodiol® auf Eis gelagert. (b) Nach Präparation und aufsetzen eines Metallrings wurde die Leber mit 4%iger Agarose ausgefüllt. (c) Schneiden der Leber zu Precision-cut Liver Slices mit dem Vibratom Leica VT 1000S in einer Dicke von 300 µm. (d) Transfer von humanen PCLS in eine Mikrotiterplatte gefüllt mit Williams Medium mit L-Glutamine und 2,24g/L NaHCO<sub>3</sub>. (a-d) Die Abbildung entstand aus eigenen Bildaufnahmen.

#### 2.14 Inkubation humaner Precision-cut Liver Slices

Für die Inkubation humaner Precision-cut Liver Slices wurden ebenso die SOPs für die Inkubation muriner Precision-cut Liver Slices übertragen (**Abbildung 5**). Die Inkubation erfolgte in 12-well Mikrotiterplatten. Zusammenfassend wurden humane Leberschnitte in 1,4 ml Williams Medium mit L-Glutamine und 2,24 g/L NaHCO<sub>3</sub> von PAN-Biotech pro well bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> auf einer programmierbaren Schüttelplatte äquivalent zu murinen PCLS inkubiert.

#### 2.15 Western Blot Analyse

Nach Homogenisierung und Lyse von Leberschnitten in RIPA-Puffer mit Protease-Inhibitoren, wurde die Proteinlösung auf eine Konzentration von 8 µg/µl in RIPA-Puffer eingestellt. Um eine finale Konzentration von 4 µg/µl zu erreichen, wurde die Lösung mit 2x Proteinauftragspuffer versetzt. Für die Western-Blot Analyse wurden 40 µg Protein pro Probe auf ein 4-20% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free Precast Gel von Bio Rad Laboratories aufgetragen. Die Auftrennung wurde in einer mit SDS-Laufpuffer gefüllten Gelkammer bei 100 V für 1 bis 2 Stunden durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine mit Hilfe von Trans-Blot® Turbo™ Mini-PVDF Transfer Packs auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Transfer der Proteine erfolgte in 30 Minuten mit Hilfe des Trans-Blot® Turbo™ Systems bei 25V und einer maximalen Stromstärke von 2,5 mA.

Um die Proteinübertragung und einen gleichmäßigen Probenauftrag zu überprüfen, wurde die Membran mit Ponceau S-Lösung für 1 Minute inkubiert. Davor wurde die Membran dreimal für jeweils 1 Minute mit H<sub>2</sub>O gewaschen.

Die Membran wurde dann mit 10% Milchpulver in TBS-T (TBS + 0,1% Tween-20) für eine Stunde bei RT geblockt. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T erfolgte die Inkubation mit Primärantikörpern in 5% BSA in TBS-T bei 4 °C über Nacht. Die Membran wurde am nächsten Tag wieder drei Mal mit TBS-T für jeweils 10 Minuten gewaschen und anschließend mit einem HRP-gekoppelten sekundären Antikörper in 10% Milchpulver in TBS-T für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach einem erneuten zuvor beschriebenen Waschvorgang mit TBS-T wurde der Blot mit einer Detektionsreagenz (SignalFire ECL oder ECL Select) benetzt und kurz inkubiert. Anschließend wurde die Lumineszenz CCD-basiert mit dem Imaging System ChemiDoc™ MP über einen Zeitraum von 2 Sekunden bis zu 10 Minuten detektiert und mit der Image Lab Software von Bio-Rad Laboratories weiterbearbeitet.

#### 2.16 Adenovirus-Produktion

Die Adenovirus-Produktion wurde durch Mitarbeiter des Instituts für Immunologie und Molekulare Onkologie, vorwiegend unter der Leitung von Dr. Dirk Wohlleber und Katrin Manske durchgeführt und dankenswerterweise für Experimente zur Verfügung gestellt. Dabei wurde mit Hilfe der Gateway<sup>®</sup> Technologie von Thermo Fisher Scientific rekombinante, replikations-defiziente Adenoviren Serotyp 5 der zweiten Generation (Deletion der E1 und E3 Proteine) generiert. Die Expressionskassetten wurden mit den Transgenen GFP, iRFP720 und Ovalbumin unter der Kontrolle des CMV-Promotors synthetisiert und mit Hilfe des Gateway<sup>®</sup> pENTR<sup>™</sup> 11 Dual Selection Vectors kloniert. Danach erfolgte die Rekombination der pENTR<sup>™</sup> 11 Vektoren mit den Expressionskassetten in den pAd/PL-DEST<sup>™</sup> Gateway<sup>®</sup> Vector. Dieser Schritt erfolgte unter der Verwendung des LR Clonase<sup>®</sup> Enzyme Mix *in vitro* nach dem Protokoll des Herstellers. Nach Linearisierung des pAd/PL-DEST<sup>™</sup> Vectors mit den Expressionskassetten erfolgte die Transfektion mit Hilfe von Lipofectamine 2000 in HEK293 Zellen. HEK293 Zellen eignen sich für die Replikation von Adenoviren, da sie die E1 Proteine des Adenovirus in ihr Genom integriert haben.

Die transfizierten Zellen wurden täglich beobachtet und durch Anschlagen der Platte vorsichtig vom Plattenboden gelöst, sofern sich die Zellen aufgrund der Virusproduktion abrundeten. Durch Freeze/Thaw-Zyklen in Stickstoff und 37 °C Wasserbad wurden die Zellen aufgebrochen, abzentrifugiert und der Zellüberstand erneut auf HEK293 Zellen verteilt. Nach 48 Stunden lösten sich die Zellen, wurden gesammelt und pelletiert, und in Viruspuffer resuspendiert. Durch erneute Freeze/Thaw-Zyklen wurden die Zellen aufgebrochen und das Virus freigesetzt. Es folgte eine Aufreinigung und Konzentrierung des Virus über eine Dichtegradienten-Zentrifugation und einer weitere Ultrazentrifugation zur präzisen Trennung von Verunreinigungen. Das für die Dichtegrad-Zentrifugation wichtige Cäsiumchlorid wurde für die *in vivo* Anwendung des Virus durch Dialyse entfernt.

Die Ermittlung des Virus-Titers erfolgt durch eine Hexontitration. Infizierte Zellen wurden dann unter dem Mikroskop gezählt und somit die infektiösen Viruspartikel pro ml Lösung bestimmt.

## IV. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wird nach Etablierung eines Precision-cut Liver Slices-Modell der TNF-induzierte Zelltod-Signalweg in virusinfizierten Leberschnitten (PCLS) als Proof of Concept beleuchtet. Basierend auf der nicht-kanonischen CD8 T-Zell-Effektorfunktion (Wohlleber et al., 2012) wird 2 Tage nach *in vivo* Infektion mit einem Adenovirus und anschließender Herstellung von PCLS die Applikation von TNF und verschiedenen Inhibitoren untersucht. Darüber hinaus werden Ergebnisse von Studien mit humanen PCLS nach Übertragung der SOPs zur Herstellung humaner PCLS vorgestellt.

### 1. Etablierung und Viabilität des Schnittkulturmodells

Die Mikroarchitektur der Leber und die Interaktion von Immunzellen mit den verschiedenen Zellpopulationen der Leber konnte *in vitro* nicht ausreichend untersucht werden. Durch die Etablierung eines Modells in Form von Precision-cut Liver Slices (PCLS) bestand die Möglichkeit die Mikroarchitektur der Leber zu erhalten und diesen Vorteil gegenüber *in vitro* Modellen wie beispielsweise der Kultur von isolierten Hepatozyten zu nutzen. Dabei bleibt das physiologische Milieu, Zell-Zell-Kontakte sowie ortsständige Zellen erhalten. Diese Vorteile von PCLS waren entscheidend für die spätere Untersuchung der nicht-kanonischen T-Zell-Effektorfunktion in der frühen Phase dieses Mechanismus (Wohlleber et al., 2012).

Durch die Erfahrung im Umgang mit dem Vibratom Leica VT1000S und der Optimierung der Arbeitsabläufe (**Abbildung 4**) sowie notwendiger technischer Installationen (**Abbildung 5**) konnte die Qualität und das Überleben der Leberschnitte verbessert werden. Wie in der Literatur beschrieben, hat auch die Verwendung von Custodiol® als Schneidepuffer, gegenüber anderen Puffern wie beispielsweise phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) dazu beigetragen (de Graaf et al., 2010; Kniepeiss et al., 2020). Zu Beginn erfolgte eine histomorphologische Evaluation und Beurteilung der hergestellten PCLS durch eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE). Dabei zeigte sich direkt nach Herstellung und nach Inkubation der Schnitte eine gut erhaltende Zellstruktur und Gewebearchitektur (**Abbildung 7a**). Im nächsten Schritt

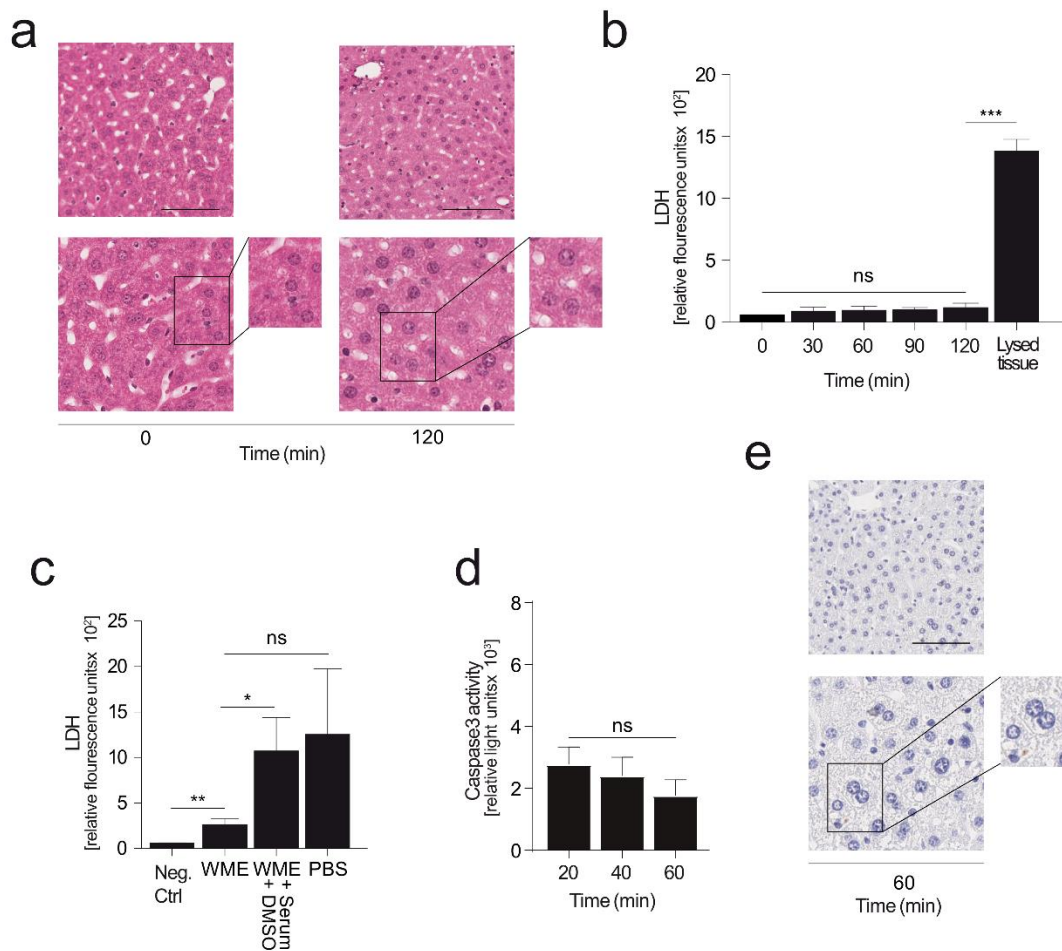
erfolgte die biochemische Untersuchung. Dabei stellte sich die Frage, ob es während der Inkubation zu einer Schädigung der Leberschnitte kommt und wie hoch tatsächlich der LDH-Anstieg als Maß für einen Zellschaden ist. Die Messung von LDH als Parameter ist eine weit verbreitete Methode, um Zellschäden sowohl in der medizinischen Diagnostik als auch in der Grundlagenforschung zu messen (Chan, Moriwaki, & De Rosa, 2013). Daher wurde eine Zeitkinetik-Messung der LDH-Freisetzung von Leberschnitten während einer Inkubationszeit von 2 h durchgeführt. Dabei konnte kein Anstieg von LDH im Inkubationsmedium gemessen werden, was für eine intakte Zellmembran und somit für eine erhaltene Viabilität der Schnitte während der Inkubation spricht (**Abbildung 7b**). Im Gegensatz dazu kam es bei der Inkubation von Leberschnitten gemeinsam mit einer *Lysis Solution* (9% Triton® X-100 in Wasser) und dem daraus resultierenden Zellschaden zu einem deutlichen Anstieg von LDH im Inkubationsmedium. Die verwendete *Lysis Solution* führt zu einer Schädigung der Zellmembran und Freisetzung von LDH in das Inkubationsmedium.

Nachdem eine standardisierte Herstellung der Leberschnitte nach eigenem Protokoll etabliert werden konnte, wurde begonnen die Inkubation zu optimieren. Dabei wurde auf die Verwendung eines Inkubationsmediums geachtet, welches möglichst wenig Interaktionen und Einflüsse gegenüber anderen verwendeten Agenzien aufweisen kann und trotzdem für die kurze Inkubationszeit eine ausreichende Viabilität der Schnitte gewährleisten kann. Dabei wurde untersucht, ob das in anderen Studien (de Graaf et al., 2010; Palma et al., 2019) häufig verwendete Williams Medium E gegenüber PBS oder primären Hepatozyten-Medium überlegen oder für die kurze Inkubationsperiode gleichwertig war. Es erfolgte die erneute Messung der freigesetzten Laktat-Dehydrogenase (LDH) in verschiedenen Inkubationsmedien. Dabei konnte gezeigt werden, dass nach einer Inkubation von PCLS in Williams Medium E zusammen mit Serum und DMSO wie beim primären Hepatozyten-Medium es zu einer erhöhten LDH-Freisetzung in das Inkubationsmedium kommt (**Abbildung 7c**). Es könnte dabei eine mögliche Schädigung der Zellmembran durch DMSO zu einer erhöhten LDH-Freisetzung führen. Weiters kommt es auch bei Inkubation von PCLS in PBS zu einem erhöhten LDH-Anstieg (**Abbildung 7c**). Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde daher die Inkubation in Williams Medium E fortgeführt, was auch mit anderen Arbeiten gut vereinbar ist (de Graaf et al., 2010; Palma et al., 2019; Starokozhko et al., 2017).

#### IV. Ergebnisse

Im Hinblick auf die folgenden Untersuchungen der nicht-kanonischen CD8 T-Zell-Effektorfunktion und des TNF-vermittelten Zelltodes, war es notwendig PCLS für eine Stunde zu inkubieren. Dies konnte in Vorversuchen ermittelt werden (Daten nicht gezeigt). Daher wurde zu Beginn der Zelltod der Schnitte mittels der Caspase 3 Aktivität in Zeitkinetik-Messungen innerhalb einer Stunde untersucht. Dabei zeigte sich innerhalb einer Inkubationszeit von einer Stunde kein signifikanter Anstieg der Caspase 3 Aktivität (**Abbildung 7d**). Trotz Anwendung des Pan-Caspasen-Inhibitors Q-VD-OPh konnte im Assay ein Signal detektiert werden, das der hohen Sensitivität des Assays und einer möglichen Hintergrundaktivierung geschuldet ist (siehe **Abbildung 10**). Daher wurde zur weiteren Untersuchung eine immunhistochemischen Färbung (IHC) für gespaltene Caspase 3 angefertigt, in der keine erhöhte Caspasen-Aktivität in PCLS nach Inkubation detektiert werden konnte (**Abbildung 7e**).

#### IV. Ergebnisse



#### Abbildung 7: Viabilität von Precision-cut Liver Slices

(a) Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) von Precision-cut Liver Slices nach Herstellung und anschließender Inkubation für 2 Stunden in WME, Skala 100  $\mu\text{m}$ . (b) Zeitkinetik-Messung der LDH Freisetzung in Williams Medium E mit L-Glutamine und 2,24g/L  $\text{NaHCO}_3$ . Als Positivkontrolle, wurde die zum CytoTox-ONE™ Assay gehörende *Lysis Solution* verwendet. (c) LDH-Freisetzung von PCLS in PBS, primären Hepatozyten-Medium (PHM + Serum + DMSO) und Williams Medium E (WME). (d) Zeitkinetik-Messung der Caspase 3 Aktivität gesunder PCLS; der Null-Wert entspricht der Caspasen-Aktivität nach Q-VD-OPh Behandlung. (e) Immunhistochemische Färbung gespaltenen Caspase 3 (CC3) in PCLS nach einer Inkubation von 60 Minuten in WME, Skala 100  $\mu\text{m}$ . (b, c, d) n=3 PCLS pro Gruppe; dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM; die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten T-Test berechnet, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . (a, e) Skala 100  $\mu\text{m}$ , oben 10-fache Vergrößerung, unten 20-fache Vergrößerung.



Um in einem weiteren Schritt hinsichtlich der Viabilität den Metabolismus von Precision-cut Liver Slices zu beurteilen, wurde bei der Auswertung auf die Hilfe eines ATP Assays sowie auf die Messung der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) durch einen O2k-Respirometer zurückgegriffen (**Abbildung 12**). Die Ergebnisse werden im Abschnitt *Bioenergetische Funktionalität von Mitochondrien in virusinfizierten Precision-cut Liver Slices* beschrieben.

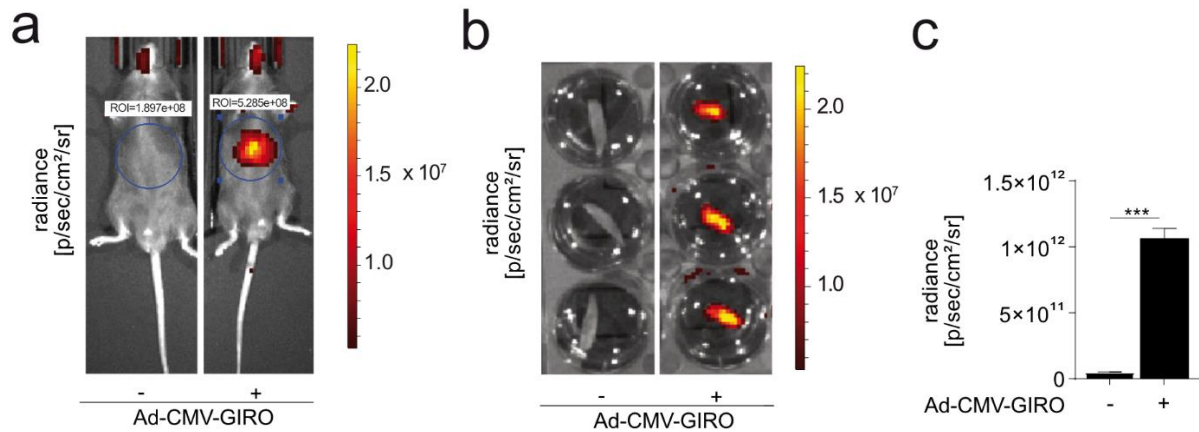
## 2. Adenovirus-Infektion von Precision-cut Liver Slices zur Studie der nicht-kanonischen CD8 T-Zell-Effektorfunktion

Um als Proof of Concept mit dem hier etablierten Modell die nicht-kanonische CD8 T-Zell-Effektorfunktion zu zeigen und damit verbundene Signalwege zu studieren, war es notwendig Precision-cut Liver Slices gegenüber TNF-induzierter Apoptose zu sensibilisieren. Aus Gründen der Reliabilität, Effizienz und Virus-Einsparungen wurde von einer *in vitro* Infektion von PCLS abgesehen. Um eine möglichst einfache und sichere Infektion der Leberschnitte zu gewährleisten wurden Mäuse *in vivo* mit einem rekombinanten, replikations-defizienten Adenovirus (Ad-CMV-GiRO) infiziert (Manske et al., 2018). Da in weiteren Untersuchungen zur nicht-kanonischen Effektorfunktion die Apoptose mit dem Caspase Glo<sup>®</sup> 3/7 Assay über die Messung der Lumineszenz erfolgt, konnte eine Infektion von PCLS mit Ad-CMV-GOL nicht vorgenommen werden. Der Grund dafür liegt in der Kodierung des Virus (Ad-CMV-GOL) für das Markergen Luziferase. 48 Stunden nach Virusinfektion mit Ad-CMV-GiRO, wurden aus der virusinfizierten Leber PCLS nach oben beschriebenen Methode hergestellt. Die 48 Stunden sind insofern relevant, da nach 48 Stunden einerseits eine ausreichende Infektion der Leber sichergestellt werden kann und andererseits eine Beeinflussung durch das adaptive Immunsystem der Maus, welches frühestens ab dem vierten Tag einsetzt, ausgeschlossen werden kann.

Um die induzierte Infektion zu visualisieren und zu verifizieren wurde mit Hilfe eines *In-vivo*-Imaging-System (IVIS) die Infektion der Maus nach 48 Stunden über die Messung der Fluoreszenz gemessen und bestätigt (**Abbildung 8a**). Im Anschluss erfolgte die zuvor beschriebene Herstellung von Precision-cut Liver Slices und ein erneuter Infektionsnachweis der Schnitte. Hier konnte vergleichbar zur *in vivo* Messung ebenso ein deutliches Fluoreszenz-Signal in virusinfizierten PCLS

#### IV. Ergebnisse

gegenüber nicht infizierten Leberschnitten detektiert werden (**Abbildung 8b**) und somit eine Infektion von PCLS für weitere Untersuchungen bestätigt werden.



**Abbildung 8: Virale Infektion *in vivo* und nach Herstellung von Precision-cut Liver Slices**

(a-c) Dargestellt sind Messungen mit einem *in-vivo*-Imaging-System (IVIS® Lumina LT Series III) (a) *In vivo* Biofluoreszenzmessung einer nicht infizierten Maus und einer Maus 48 Stunden nach Infektion mit Ad-CMV-GiRO ( $5 \times 10^8$  PFU). (b) Ex *in vivo* Biofluoreszenzmessung von nicht infizierten und virusinfizierten Leberschnitten. (c) Quantitative Messung der viralen Infektion von nicht infizierten und virusinfizierten PCLS. (a) Dargestellt ist eine repräsentative Messung aus  $n \geq 3$  unabhängigen Experimenten (b, c)  $n=3$  PCLS pro Gruppe. (c) Gezeigt werden Mittelwerte  $\pm$  SEM; die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten T-Test berechnet, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3. TNF führt zu Apoptose in virusinfizierten Precision-cut Liver Slices

Die Apoptose im Rahmen des TNF-vermittelten Zelltodes konnte zu Beginn nur *in vivo* gezeigt werden (Wohlleber et al., 2012). Neuerdings konnte eine Apoptoseinduktion auch in virusinfizierten primären humanen Hepatozyten ca. 4-5 Stunden nach TNF-Challenge nachgewiesen werden (Lampl et al., 2020). Die Frühphase dieses Mechanismus konnte jedoch in virusinfizierten isolierten Hepatozyten (innerhalb einer Stunde) bislang noch nicht gezeigt werden und ist vermutlich auf das Fehlen des komplexen Zusammenspiels einer Zell-Zell-Kommunikation auf dreidimensionaler Ebene zurückzuführen, da die Hepatozyten durch die Isolation aus ihrer natürlichen Matrix „gerissen“ werden. Durch die Anwendung des hier beschriebenen Systems, kann das physiologische Milieu der Hepatozyten *ex vivo* erhalten bleiben und ist somit entscheidend bei Untersuchungen zur nicht-kanonischen CD8 T-Zell-Effektorfunktion *ex vivo* innerhalb einer Stunde.

Zellphysiologisch kommt es nach Aktivierung des TNFR1 zur Bildung von TNFR-Komplex II, der zu einer Aktivierung von Caspase 8 führt (Micheau & Tschopp, 2003). Die Apoptose umfasst dann die Aktivierung der Initiator-Caspasen 8 und 9 und der anschließenden Effektor-Caspase 3. Caspase 8 kann die Effektor-Caspase 3 auch direkt aktivieren. In Hepatozyten erfolgt eine Verstärkung dieser Caspase 3-Aktivierung durch Caspase 8 via Amplifikation des Signals über den mitochondrialen Signalweg (Ding & Yin, 2004) (*siehe **Abbildung 3***).

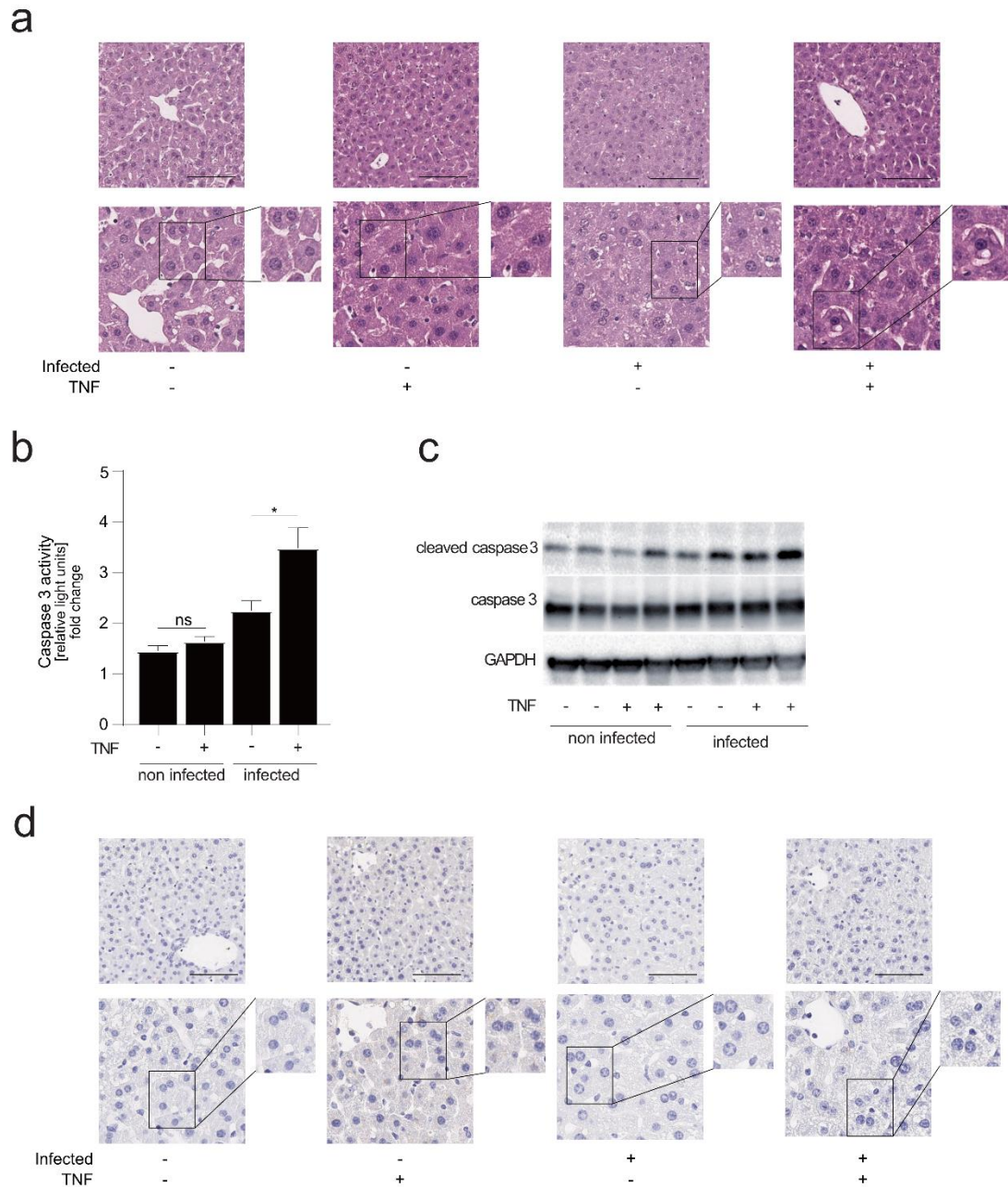
Zu Beginn erfolgte eine morphologische Untersuchung von virusinfizierten und nicht infizierten murinen PCLS mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE). Diese zeigten bei gesunden nicht infizierten PCLS und bei virusinfizierten PCLS sowohl ohne als auch mit TNF-Applikation keine detektierbaren Zellschäden (***Abbildung 9a***). Um die Apoptose im Rahmen des TNF-vermittelten Zelltodes bzw. der nicht-kanonischen CD8 T-Zell-Effektorfunktion zu zeigen, wurde die Caspase 3-Aktivierung mit Hilfe des Caspase Glo<sup>®</sup> 3/7 von Promega gemessen. TNF-Applikation für eine Stunde, führte dabei in virusinfizierten Precision-cut Liver Slices zu einer Erhöhung der Caspase 3 Aktivität. Kein Anstieg der Caspase 3 Aktivität konnte hingegen nach TNF-Behandlung in gesunden, nicht infizierten Leberschnitten gezeigt werden (***Abbildung 9b***). Zusätzlich wurde die Spaltung der Caspase 3, die der Aktivierung entspricht, in einer

#### IV. Ergebnisse

Western Blot Analyse verifiziert. Dabei konnte in virusinfizierten PCLS nach TNF-Applikation im Vergleich zu nicht infizierten PCLS mehr gespaltene Caspase nachgewiesen werden (**Abbildung 9c**). Dieses Ergebnis in der Western Blot Analyse ist zusätzlich ein Hinweis, dass es sich bei diesem Zelltod um Apoptose handelt. In der immunhistochemischen Untersuchung konnte hingegen keine Zunahme an Caspase 3 Aktivität bei virusinfizierten Leberschnitten nach TNF-Applikation detektiert werden (**Abbildung 9d**). Im Vergleich zu *in vivo* Untersuchungen wird ein Signal der Caspase 3 Aktivität in der immunhistochemischen Färbung erst 2 Stunden nach TNF-Gabe detektiert (Dr. Dirk Wohlleber). Somit ist die Inkubation von virusinfizierten PCLS nach TNF-Challenge mit einer Stunde zu kurz, um ein Ergebnis in der immunhistochemischen Färbung zu erwarten.

Zusammenfassend, konnte mit dem etablierten Modell gezeigt werden, dass TNF-Applikation selektiv in virusinfizierten, nicht aber in gesunden Precision-cut Liver Slices Apoptose induziert. Diese Ergebnisse stimmen mit Veröffentlichungen von Wohlleber et. al. aus 2012 überein. Im Rahmen von *in vivo* Studien konnte bei virusinfizierten Mäusen nach TNF-Gabe im Vergleich zu nicht infizierten Mäusen Apoptose über die Messung der ALT nachgewiesen werden (Wohlleber et al., 2012). Die ALT-Aktivität stellt dabei einen klinischen Parameter für Leberzellschädigung dar.

#### IV. Ergebnisse

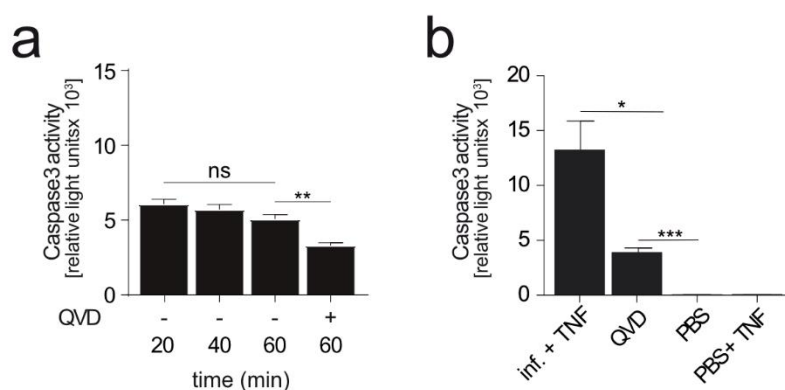


**Abbildung 9: TNF-induzierter Zelltod bei virusinfizierten Hepatozyten**

(a) Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE) nicht infizierter und virusinfizierter Precision-cut Liver Slices mit oder ohne TNF-Applikation von einer 1 Stunde. (b) Caspase 3 Aktivität nicht infizierter und virusinfizierter PCLS nach TNF Gabe im Vergleich zu nicht virusinfizierten; der Null-Wert entspricht der Caspasen-Aktivität nach Q-VD-OPh Behandlung (c) Detektion gespaltener Caspase 3 (CC3) in der Western Blot Analyse von PCLS; n=2 PCLS pro Gruppe, GAPDH wurde als Ladekontrolle detektiert. (d) Immunhistochemische Färbung gespaltener Caspase 3 in nicht infizierten und virusinfizierten PCLS mit oder ohne TNF-Applikation von 1 Stunde. (b) n=3 PCLS pro Gruppe; dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM; die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten T-Test berechnet, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . (a, d) Skala 100  $\mu$ m, 10-fache Vergrößerung oben, 20-fache Vergrößerung unten

#### IV. Ergebnisse

Im Rahmen der Untersuchungen konnte eine Caspase 3 Aktivität auch bei nicht infizierten gesunden Leberschnitten gemessen werden. Dadurch stellte sich die Frage, ob ein Hintergrund-Signal ausgehend vom Lebergewebe vorhanden ist. Infolgedessen wurde der zeitliche Verlauf der Caspase 3 Aktivität bei gesunden nicht infizierten PCLS innerhalb einer Stunde untersucht. Die Studien zeigten eine über die Zeit gleichbleibende Caspase 3 Aktivierung bei PCLS, gemessen mit dem Caspase Glo<sup>®</sup> 3/7 Assay von Promega (**Abbildung 10a**). Bei der Anwendung des Pan-Caspasen-Inhibitors Q-VD-OPh, in einer in Vorversuchen ermittelten Konzentration, konnte eine leichte Reduktion der Caspase 3 Aktivierung gesehen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass es bei den Messungen eine „Hintergrund-Aktivierung“ bei der Anwendung des Caspase Glo<sup>®</sup> 3/7 bei PCLS geben muss. Entsprechend stellte sich die Frage, ob das gemessene Signal mit Hilfe des Caspase-Assays, durch TNF, durch den Caspase Glo<sup>®</sup> 3/7 an sich oder durch das Lebergewebe verursacht wird. Ein Signal durch die Interaktion mit TNF als auch ein Signal vom Caspase Glo<sup>®</sup> 3/7 konnte in den Untersuchungen ausgeschlossen werden (**Abbildung 10b**). Um im weiteren Verlauf ein Monitoring dieser „Hintergrund-Aktivierung“ zu gewährleisten, wurde bei weiteren Versuchen zur Untersuchung von Signalwegen der Pan-Caspasen-Inhibitor Q-VD-OPh angewendet. Q-VD-OPh inhibiert dabei Apoptose und sämtliche Caspasen (Caserta, Smith, Gultice, Reedy, & Brown, 2003). Die relative Lumineszenz, die bei PCLS mit Q-VD-OPh detektiert wurde, wurde von den anderen Messungen ohne Q-VD-OPh als „Hintergrund-Aktivierung“ (Baseline) abgezogen.



**Abbildung 10: Hintergrund-Signal von Caspase 3 Aktivität in nicht infizierten Precision-cut Liver Slices**

(a) Zeitkinetik-Messung der Caspase 3 Aktivität bei nicht infizierten gesunden Precision-cut Liver Slices; Inkubation in Williams Medium E; zusätzliche Inhibition der Caspase-Aktivierung durch 10  $\mu$ M Q-VD-OPh. (b) Caspase 3 Aktivität zur Überprüfung des Hintergrund-Signals durch den Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 oder durch Interaktion mit TNF. (a, b) n=3 PCLS pro Gruppe; dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM; die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten T-Test berechnet, \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.

#### 4. Inhibitoren des NOX–Signalweges reduzieren die Caspase 3-Aktivität in virusinfizierten Precision-cut Liver Slices nach TNF Applikation

Im Rahmen der Arbeit stellte sich die Frage, ob sich Precision-cut Liver Slices auch zu Untersuchung von Hepatozyten-intrinsischen Signalwegen eignen. Dazu wurden virusinfizierte PCLS vor TNF-Applikation mit Inhibitoren des NOX-Signalweges behandelt.

Neben der Aktivierung von Caspase 8 nach TNF-Bindung kann es auch zu einer Aktivierung der membranständigen NADPH-Oxidase (NOX) über die Riboflavin-Kinase kommen (Yazdanpanah et al., 2009). Nach der Aktivierung der Phospholipase C  $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) kommt es zur Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) und der Bindung von IP<sub>3</sub> an den IP<sub>3</sub>-Rezeptor des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Diese Bindung führt zu einer Freisetzung von Calcium-Ionen (Ca<sub>2+</sub>) aus dem ER (Marchant & Taylor, 1997) und in weiterer Folge einer Aktivierung der Effektorcaspase 3 mit anschließender Apoptose-Aktivierung (Rasola & Bernardi, 2011; Szalai et al., 1999). Dieser Signalweg (*siehe **Abbildung 3***) spielt in virusinfizierten Mäusen eine entscheidende Rolle für die TNF-vermittelte Apoptose und kann durch die Anwendung folgender Inhibitoren untersucht werden.

Erneut konnte bei virusinfizierten Precision-cut Liver Slices nach TNF-Applikation eine erhöhte Caspase 3 Aktivität in den nachfolgenden Versuchen, in denen spezifische Inhibitoren zu Anwendung kamen, nachgewiesen werden (***Abbildung 11***). Diese Ergebnisse unterstützen zusätzlich das Modell für den molekularen Mechanismus der TNF-vermittelten Apoptose in virusinfiziertem PCLS (***Abbildung 9b***).

Durch die Anwendung des ROS-Inhibitors Luteolin konnte die Caspase 3 Aktivität in virusinfizierten PCLS nach TNF-Applikation deutlich reduziert werden (***Abbildung 11a***). Dieses Ergebnis korreliert mit Untersuchungen von *in vivo* Experimenten bei virusinfizierten Mäusen nach TNF-Applikation und Luteolin-Gabe. Dort konnte ebenfalls nach der Inhibition von ROS, eine ALT-Reduktion ermittelt werden (Gärtner, 2011 u. Dr. Dirk Wohlleber, nicht publizierte Daten).

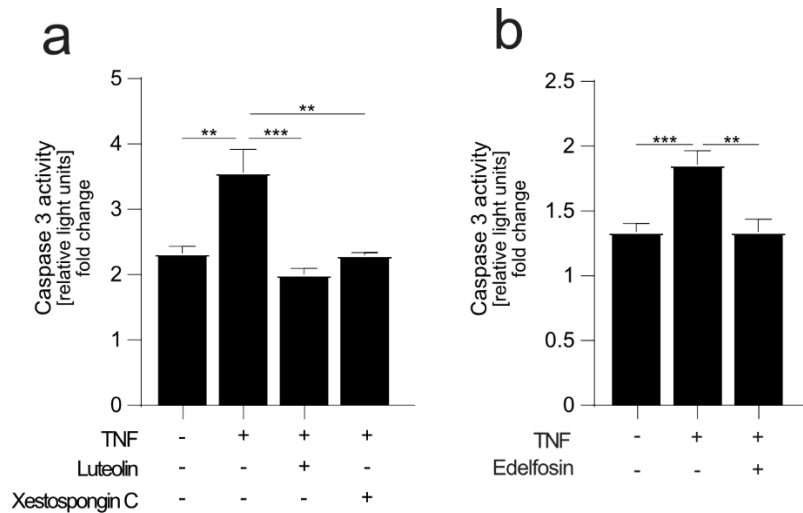
Als nächstes konnte die Inhibition der Phospholipase C  $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) durch die Anwendung von Edelfosin gewährleistet werden. Nach TNF Applikation und gleichzeitiger Gabe

von Edelfosin konnte die Caspase 3 Aktivität in virusinfizierten PCLS nachweislich reduziert werden (**Abbildung 11b**). Somit kommt es durch die Inhibition der PLC $\gamma$  zu einer verminderten IP $_3$ -Bildung und reduzierten Ca $_{2+}$ -Freisetzung aus dem ER. Dieser Effekt von Edelfosine nach TNF Applikation konnte auch *in vivo* untersucht und nachgewiesen werden (Sandra Kurz, Dr. Dirk Wohlleber, nicht publizierte Daten).

Eine weitere Ca $_{2+}$ -Freisetzung aus dem ER und somit weitere Untersuchung des NOX-Signalweges wurde durch die Anwendung von Xestospongin C durchgeführt. Xestospongin C führt dabei zu einer Inhibition des IP $_3$ -Rezeptors des Endoplasmatischen Retikulums (De Smet et al., 1999). Die Herausforderung bei Untersuchungen des NOX-Signalweges mit Xestospongin C bei *in vivo* Modellen liegt in der systemischen Toxizität dieses Inhibitors und macht eine Anwendung am Mausmodell nicht möglich. Hingegen ist eine Anwendung von Xestospongin C an Precision-cut Liver Slices uneingeschränkt möglich. In virusinfizierten PCLS konnte nach TNF Applikation und zusätzlicher Gabe von Xestospongin C eine Reduktion der Caspase 3 Aktivität untersucht werden (**Abbildung 11a**).

Zusammenfassend konnte mit Hilfe von virusinfizierten Precision-cut Liver Slices eine Caspase 3 Reduktion nach TNF-Gabe nachgewiesen werden. Somit kann durch die Reduktion von ROS, sowie der Inhibition der PLC $\gamma$  und des IP $_3$  Rezeptors eine Beteiligung des NOX-Signalweges in der TNF-vermittelten nicht-kanonischen CD8 T-Zell-Effektorfunktion weiter diskutiert werden. Durch die gute Vergleichbarkeit mit *in vivo*-Studien wird auf die Verlässlichkeit von PCLS-Modellen aufmerksam gemacht. Zusätzlich wird gezeigt, dass systemisch wirksame Inhibitoren an PCLS uneingeschränkt anwendbar sind.





**Abbildung 11: Caspase 3 Aktivität nach Anwendung von Inhibitoren bei virusinfizierten PCLS**

(a-b) TNF-Applikation in virusinfizierten PCLS für 1 Stunde und Auswertung der Caspase 3 Aktivität nach Anwendung von Inhibitoren. Der Null-Wert entspricht der Caspasen-Aktivität nach Q-VD-OPh Behandlung. (a) Caspase 3 Aktivität in virusinfizierten PCLS nach ROS-Inhibition mit 10  $\mu$ M Luteolin und Inhibition des IP<sub>3</sub>-Rezeptors mit 5  $\mu$ M Xestospongin C. (b) Caspase 3 Aktivität nach Inhibition der Phospholipase C  $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) mit 28.8  $\mu$ M Edelfosin. (a-b) n=3 PCLS pro Gruppe; dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM; die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten T-Test berechnet, \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.

## 5. Bioenergetische Funktionalität von Mitochondrien in nicht infizierten und virusinfizierten Precision-cut Liver Slices

Mitochondrien sind die Kraftwerke der Zellen und für die Energieversorgung verantwortlich. Die größte Energie schöpfen sie dabei aus dem Abbau von Glukose durch die oxidative Phosphorylierung. Darüber hinaus spielen sie aber auch eine zentrale Rolle in zellulären Stresssituationen und beim Zelltod (Galluzzi, Kepp, & Kroemer, 2012).

Um in einem zusätzlichen Schritt die Viabilität von Precision-cut Liver Slices zu beurteilen, wurde der Metabolismus mit Hilfe eines ATP Assays untersucht (**Abbildung 12**). In den Ergebnissen konnte deutlich gezeigt werden, dass es zu einem Anstieg der ATP-Bildung mit Beginn der Inkubation und somit zu einer Steigerung der Syntheseleistung von Precision-cut Liver Slices (PCLS) kommt (**Abbildung 12a**).

ATP ist dabei ein wichtiger Regulator energieliefernder Prozesse (Senior, 1988). Die Ergebnisse zeigen, dass unter den hier beschriebenen Inkubationsbedingungen, PCLS metabolische Aktivität und somit Viabilität gewährleisten.

Weiters konnte durch die Messung der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) durch einen O2k-Respirometer von Oroboros Instruments aus Innsbruck, Informationen über den zellulären Energie-Metabolismus gewonnen werden. Mit einem O2k-Respirometer kann unter Echtzeit die Zellatmung unter dem Monitoring der oxidativen Phosphorylierung von Zellen im Modell untersucht werden (**Abbildung 12b**). Das schnelle Ansprechen auf Substrate und Inhibitoren der oxidativen Phosphorylierung bei der Messung mit dem Respirometer beweist eine entsprechende mitochondriale Leistung und Viabilität (**Abbildung 12b, c**). Es konnte gezeigt werden, dass die Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) von Precision-cut Liver Slices nach der Zugabe von Succinat (Gnaiger, 2014) und der Reduktion des Protonengradienten als Folge der Zugabe von ADP (Brand & Nicholls, 2011), zunimmt (**Abbildung 12b**). Antimycin A blockiert den Komplex III der Atmungskette (Rieske, Baum, Stoner, & Lipton, 1967) und zeigte in den Untersuchungen eine deutliche Abnahme der OCR (**Abbildung 12b**).

Bei adenoviralen Infektionen wird eine Veränderung der mitochondrialen Funktionalität diskutiert. Dadurch können Mitochondrien nach Erkennen einer Infektion die infizierten Zellen in einen vor-apoptischen Zustand versetzen, der aus einer Reduktion der mitochondrialen Belastbarkeit resultiert. Diese reduzierte mitochondriale Belastbarkeit könnte durch einen erhöhten Energiebedarf und somit einer bioenergetischen Überforderung zustande kommen (Lampl et al., 2020).

Für die Untersuchung einer bioenergetischen Überforderung erfolgte die Messung der bioenergetischen Aktivität von nicht infizierten und virusinfizierten PCLS und die Erstellung eines bioenergetischen Profils. Da die Energieproduktion die Hauptfunktion der Mitochondrien ist, wurde die Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) der PCLS mit Hilfe des O2k-Respirometers gemessen (**Abbildung 12b**). Die Sauerstoffverbrauchsrate kann dabei mit der Aktivität der Elektronentransportkette (ETC) und der Energieproduktion gleichgesetzt werden. Zunächst wurde Succinat bereitgestellt, um die basale Atmung der PCLS und deren Mitochondrien zu bestimmen. Succinat ist ein Elektronenreservoir und wird in die Elektronentransportkette aufgenommen (Gnaiger,

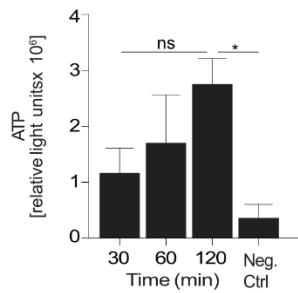
2014). In der basalen Atmung von nicht infizierten und virusinfizierten PCLS zeigte sich kein Unterschied (**Abbildung 12c**).

Der Sauerstoffverbrauch ist neben dem Elektronentransport auch immer vom Protonengradienten abhängig. Durch den Anstieg des Protonengradienten wird die Atmung gehemmt. Der Protonengradient konnte durch die Zugabe von ADP und anschließender Bildung von ATP reduziert werden und somit der Sauerstoffverbrauch gesteigert werden (Brand & Nicholls, 2011; Chance & Williams, 1955). Eine weitere Steigerung der OCR konnte durch die Zugabe von Cytochrom C erreicht werden. Cytochrom C ist essenziell im mitochondrialen Elektronentransport (Huttemann et al., 2011). Durch die Gabe des ATP-Synthase-Inhibitors Oligomycin wurde der Sauerstoffverbrauch reduziert. Die dann verbleibende OCR wird auch als Leckatmung oder Protonen-Leck bezeichnet, welche durch einen ATP-Synthase unabhängigen Leckstrom von Protonen funktioniert (Gnaiger, 2014). Im nächsten Schritt wurde die Zellatmung durch die Gabe des Protonophors CCCP von der ATP-Synthase entkoppelt. Die Atmung war somit nicht mehr vom Protonengradienten limitiert sondern konnte ihre volle Kapazität über die Elektronentransportkette ausschöpfen (Brand & Nicholls, 2011). Zum Ende wurde die Atmungskette durch die Gabe des Komplex III Inhibitors Antimycin A blockiert und die Sauerstoffverbrauchsrate somit reduziert (Rieske et al., 1967).

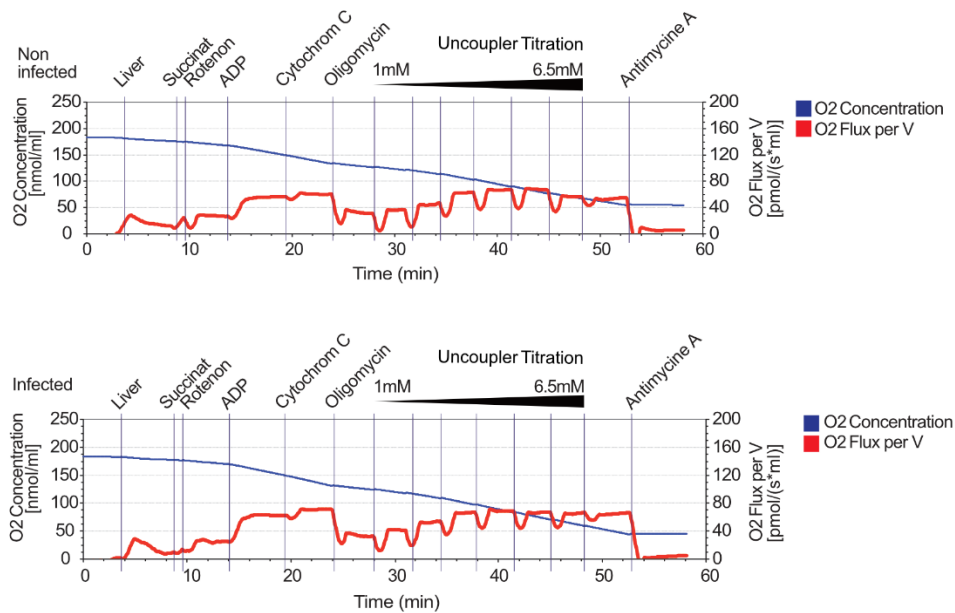
Zusammenfassend zeigen sich in dem bioenergetischen Profil zwischen nicht infizierten und virusinfizierten Precision-cut Liver Slices (PCLS) keine Unterschiede (**Abbildung 12c**). Diese Ergebnisse unterstützen auch Beobachtungen an isolierten Lebermitochondrien, die nach viraler Infektion keine Modifikationen am Energiemetabolismus zeigen (Lampl et al., 2020). Zusätzlich wird durch die Bestätigung eines intakten Metabolismus von PCLS ein weiterer Beitrag zum Nachweis der Viabilität von PCLS nach der hier beschriebenen Methode geleistet.

## IV. Ergebnisse

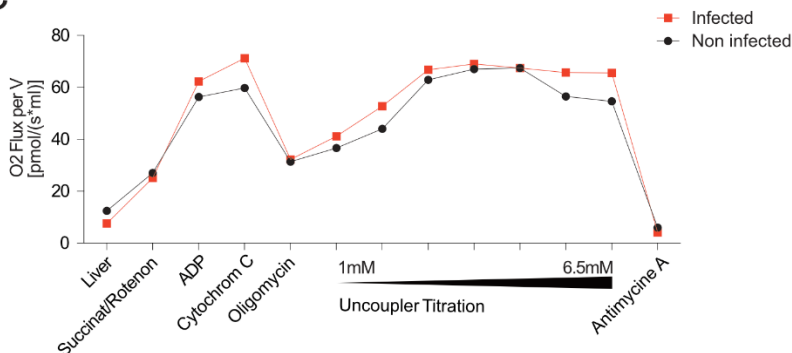
a



b



c



**Abbildung 12: Metabolismus von Precision-cut Liver Slices**

(a) Zeitkinetik-Messung der Quantifizierung von ATP als Zeichen metabolisch aktiver Zellen gemessen mit dem CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay. (b) Darstellung der Echtzeitmessung von Sauerstoffverbrauchsrate (rot) und Sauerstoffkonzentration (blau) gesunder (oben) und virusinfizierter (unten) PCLS sowie Ansprechverhalten von Substraten der oxidativen Phosphorylierung durchgeführt mit einem O2k Respirometer von Oroboros Instruments. (c) Vergleich bioenergetischer Profile virusinfizierter und nicht infizierter PCLS anhand eines SUIT-Protokolls. (a) n=3 PCLS pro Gruppe; dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM; die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten T-Test berechnet, \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001. (b,c) Dargestellt ist ein Experiment aus n>3 unabhängigen Experimenten.

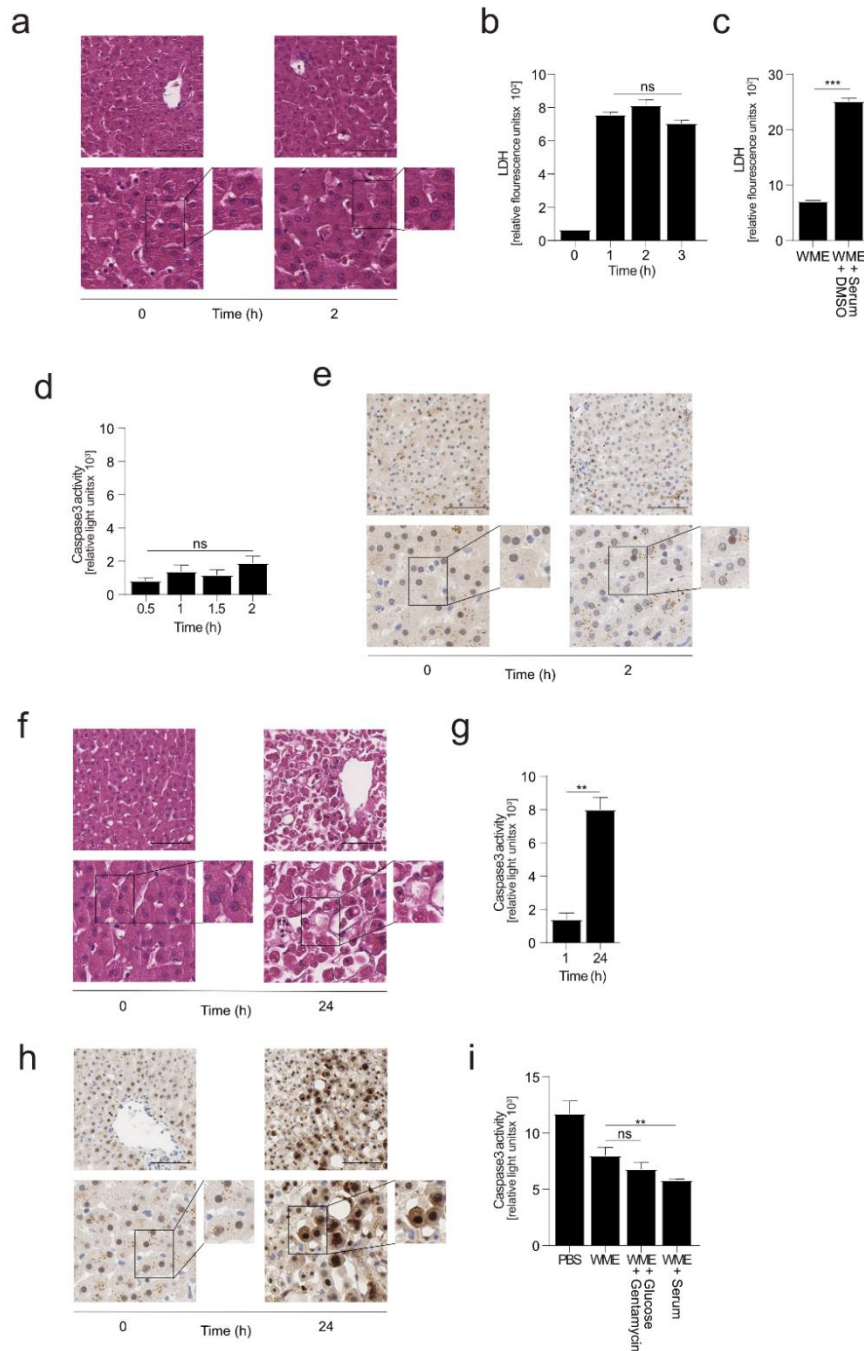
## 6. Übertragung der SOPs auf humane Precision-Cut Liver Slices

Die komplexe Pathogenese von Leberschädigungen beim Menschen kann mit den derzeit verwendeten *in vitro*-Zellkulturmodellen und *in vivo*-Tiermodellen nicht ausreichend nachgeahmt werden. Zusätzlich dazu bestehen wesentliche Unterschiede zwischen den Immunsystemen von Mäusen und Menschen (Mestas & Hughes, 2004). Um im Rahmen der Promotionsarbeit den translationalen Aspekt in den Fokus zu rücken, stellte sich die Frage, ob die für die Herstellung von murinen Precision-cut Liver Slices etablierte Methode auch auf humanes Gewebe möglich wäre. Parallelen in der Herstellung und Inkubation von murinen und humanen Precision-cut Liver Slices wurden bereits vorbeschrieben (de Graaf et al., 2010).

Nach Herstellung von humanen PCLS wie im Methodenteil beschrieben, wurde die Viabilität der Schnitte zuerst durch eine histologische Untersuchung überprüft. Dabei zeigten Hämatoxilin-Eosin-Färbungen (HE) analog zu murinen PCLS eine gut erhaltende Zellstruktur und Gewebearchitektur nach Herstellung und Inkubation von 2 Stunden (**Abbildung 13a**). Die biochemische Untersuchung mittels Messung der Laktat-Dehydrogenase-Ausschüttung (LDH) zeigte zu Beginn eine erhöhte Freisetzung, die im Verlauf aber innerhalb von 2 Stunden konstant blieb. Auch nach dreistündiger Inkubation humaner Schnitte zeigte sich keine weitere LDH-Freisetzung (**Abbildung 13b**). Bei einer Inkubation in Williams Medium E mit DMSO und Serum zeigte sich identisch zu den Ergebnissen von murinen PCLS auch eine deutlich erhöhte LDH-Freisetzung in das Inkubationsmedium (**Abbildung 13c**). Bei der Untersuchung von Zelltod mithilfe der Messung der Caspase 3 Aktivität in humanen PCLS zeigte sich innerhalb einer zweistündigen Inkubation keine signifikante Erhöhung der Caspase-Aktivität (**Abbildung 13d**). Auch hier konnte nach Anwendung des Pan-Caspasen-Inhibitors Q-VD-OPh ein Signal für Caspase 3 Aktivität detektiert werden (vergleiche **Abbildung 10**). Zusätzlich wurde eine immunhistologische Färbung mittels Primär-Antikörper gegen gespaltene Caspase 3 durchgeführt. Eine Caspase-Aktivierung konnte dabei nach Herstellung als auch nach zweistündiger Inkubation nicht ermittelt werden (**Abbildung 13e**). Somit zeigen die nach dem hier beschriebenen Verfahren hergestellten humanen PCLS eine ausreichende Viabilität analog zu murinen PCLS innerhalb von 2 bis 3 Stunden.

Im Hinblick auf eine eventuelle zukünftige *ex vivo* Infektion von humanen PCLS mit einem Adenovirus und anschließender Untersuchung von TNF-induzierten Zelltod wurde die Caspase 3 Aktivität erneut innerhalb von 2 Stunden und einmalig nach 24 Stunden gemessen. Dazu wurde die Caspase-Aktivierung von PCLS nach einer Kurzzeitinkubation, mit der einer Langzeitinkubation von 24 Stunden verglichen. In den Ergebnissen zeigte sich eine deutliche Erhöhung der Caspase 3 Aktivität in humanen PCLS bei einer Inkubation von 24 Stunden (**Abbildung 13g**). Ebenso konnte in der immunhistochemischen Färbung für gespaltene Caspase 3 eine deutliche Aktivierung nach einer Inkubation humaner Schnitte von 24 Stunden bestätigt werden (**Abbildung 13h**). Um eine ausreichende Viabilität und Funktionalität von humanen PCLS über 24 Stunden zu erreichen, müssten unter anderem Modifikationen am Inkubationsmedium vorgenommen werden (de Graaf et al., 2010; Starokozhko et al., 2015; Vickers et al., 2004). Eine Inkubation von humanen PCLS mit dem hier beschriebenen System zeigte einen Trend zur Reduktion der Caspase 3 Aktivität bei Hinzugabe von zusätzlicher Glucose zu WME und eine weitere Reduktion durch den Einsatz von fetalem Kälberserum (**Abbildung 13i**).

## IV. Ergebnisse



**Abbildung 13: Viabilität humaner Precision-Cut Liver Slices**

(a) Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) humaner PCLS nach Herstellung und Inkubation. (b) LDH-Freisetzung von PCLS während der Inkubation in Williams Medium mit L-Glutamine und 2,24g/L NaHCO<sub>3</sub> (WME). (c) LDH-Freisetzung humaner PCLS in WME und primären Hepatozyten-Medium (WME + Serum + DMSO) nach 3 Stunden. (d) Zeitkinetik-Messung der Caspase 3 Aktivität in humanen PCLS. (e) Immunhistochemische Färbung gespaltener Caspase 3 (cl. Casp3 – braun) in humanen PCLS nach Herstellung und Inkubation. (f) Vergleich von Kurzzeitinkubation (1h) und Langzeitinkubation (24h) mittels HE-Färbung, (g) Caspase 3 Aktivität und (h) immunhistochemischer Färbung für CC3 (cl. Casp3 – braun). (i) Caspase 3 Aktivität nach 24-stündiger Inkubation in PBS, WME, WME + Glucose + Gentamycin und WME + 5% FCS. (a-i) n=3 PCLS pro Gruppe, dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM; die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten T-Test berechnet, \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001. (d, g, i) Der Null-Wert entspricht der Caspasen-Aktivität nach Q-VD-OPh Behandlung. (a, e, f, h) Skala 100  $\mu$ m, oben 10-fache Vergrößerung, unten 20-fache Vergrößerung.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse eine gute Viabilität von humanen Precision-cut Liver Slices und eine erfolgreiche Übertragung der SOPs von murinen auf humanes Gewebe innerhalb von 3 Stunden. Allerdings werden wie erwartet auch die Limitationen der hier etablierten Methode hinsichtlich der Langzeitinkubation von mehr als 24 Stunden aufgezeigt. Eine *ex vivo in vitro* Infektion humaner PCLS mit einem Adenovirus zur Untersuchung der nicht-kanonischen CD8 T-Zell-Effektorfunktion ist aktuell mit dem hier etablierten Modell nicht möglich und bedarf einer Optimierung der Inkubationsbedingungen und im Besonderen eine Modifikation des Inkubationsmediums um eine ausreichende Viabilität über 24 Stunden zu garantieren.

Nach der Etablierung und Sicherstellung der Viabilität von humanen PCLS, konnten diese in einem Kooperationsprojekt mit der chirurgischen Abteilung des Klinikums rechts der Isar unter der Leitung von PD Dr. Laschinger angewendet werden (Laschinger et al., 2020).

## 7. Precision-cut Liver Slices zur Untersuchung des CGRP-RAMP1-Signalweges nach partieller Hepatektomie

Im Rahmen der Etablierung des Systems stellte sich die Frage, ob eine Anwendung der Methode auch bei gentechnisch modifizierten Mäusen funktionieren kann. Dazu wurden in einem Kooperationsprojekt mit der Chirurgischen Abteilung des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München unter der Leitung von PD Dr. Melanie Laschinger Precision-cut Liver Slices aus RAMP1-Knockout-Mäusen hergestellt und für Studien zur Leberregeneration angewendet.

In der Arbeit von Laschinger et. al (2020) wurde die Rolle der CGRP-Rezeptor-Untereinheit RAMP1 nach partieller Hepatektomie und CCl<sub>4</sub>-induzierten Schädigung untersucht. RAMP1 spielt in der Leberregeneration eine wichtige Rolle. RAMP1 reguliert G-Protein-vermittelt (Gingell, Hendrikse, & Hay, 2019; Holzmann, 2013; Walker, Conner, Poyner, & Hay, 2010) die paralogen Transkriptionsaktivatoren YAP und TAZ (Miller et al., 2012; Yu et al., 2013; Yu et al., 2012). Der Verlust von YAP und TAZ führt zu Defekten in der Leberregeneration (Lu, Finegold, & Johnson, 2018).

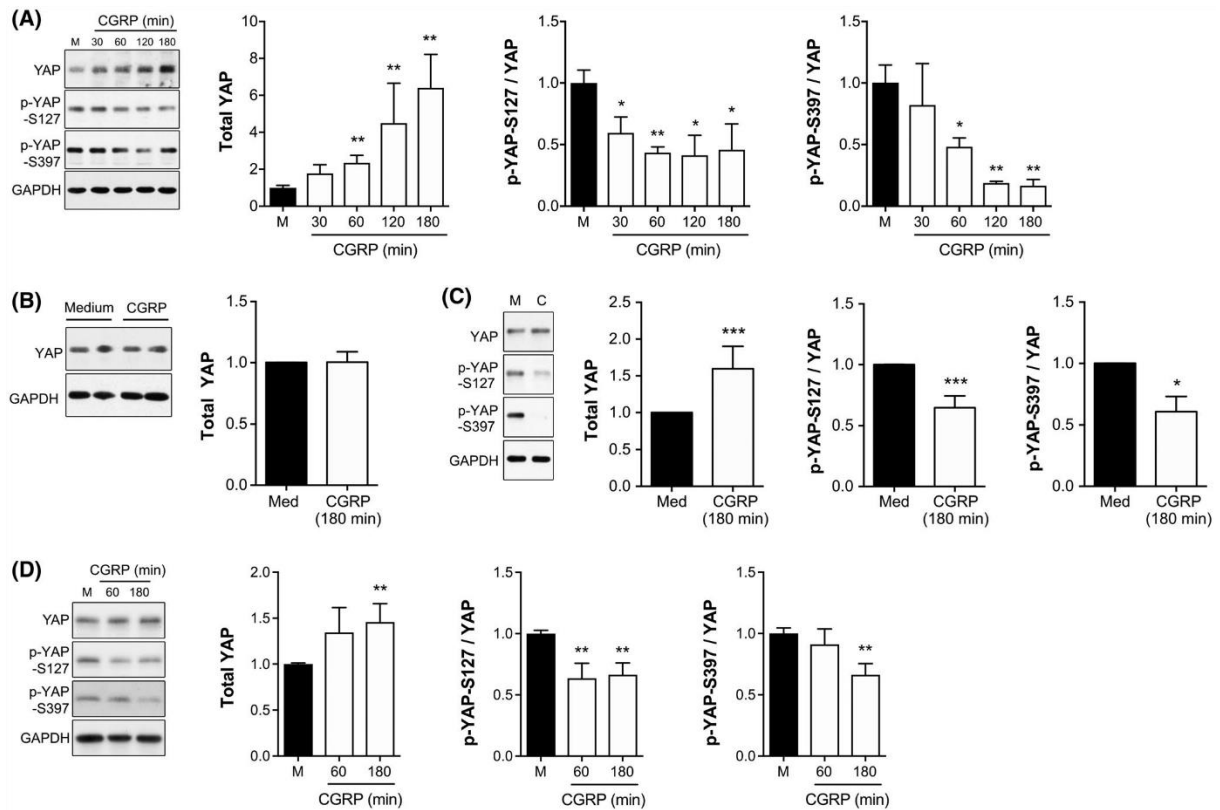


#### IV. Ergebnisse

Daher stellte sich die Frage, ob RAMP1 zu einer Förderung der Leberregeneration durch den Einfluss der YAP/TAZ-Expression und -Aktivität führt.

Für die Untersuchungen wurden Precision-cut Liver Slices von Wildtyp-Mäusen, RAMP1-Knockout-Mäusen und humaner Leber angefertigt und anschließend mit *Calcitonin gene-related peptide* (CGRP) stimuliert. Die Expression der zwei transkriptionellen Koaktivatoren, *Yes-associated protein* (YAP) und *transcriptional co-activator with PDZ-binding motif* (TAZ) wurden mittels Western Blot ermittelt. Die Ergebnisse zeigen in PCLS von Wildtyp-Mäusen nach CGRP-Stimulation eine zeitabhängige und signifikante Erhöhung von YAP Protein. Parallel dazu, war die Phosphorylierung von YAP nach CGRP-Behandlung reduziert (**Abbildung 14a**). Zusätzlich konnte in PCLS aus RAMP1-Knockout-Mäusen gezeigt werden, dass die Expression von YAP durch CGRP abhängig vom Vorkommen von RAMP1 ist (**Abbildung 14b**). Weiters konnte nach Übertragung der SOPs zur Herstellung humaner Precision-cut Liver Slices (*siehe* **Abbildung 13**) die Hochregulation der YAP-Expression und die Herunterregulierung der YAP Phosphorylierung in humanen PCLS nach CGRP-Stimulation gezeigt werden (**Abbildung 14c**).

## IV. Ergebnisse



**Abbildung 14: YAP-Expression und YAP-Phosphorylierung nach CGRP Behandlung in Precision-cut Liver Slices (Laschinger et al., 2020)**

Abbildung 14 und die dazugehörige Abbildungslegende wurden aus der Veröffentlichung von Laschinger et al. im FASEB Journal (2020) entnommen: CGRP treatment enhances YAP protein expression and attenuates YAP phosphorylation in liver tissue and primary hepatocytes. Precision-cut liver slices derived from wild-type mice (A), RAMP1-deficient mice (B), or human patient samples (C), as well as primary human hepatocytes (D) were stimulated with 100 nM of CGRP for the indicated time periods. Total protein extracts were analyzed by Western blotting for the expression of YAP and phosphorylation of YAP on Ser127 or Ser397. Levels of YAP phosphorylation were normalized against total YAP protein levels. Representative gels and densitometric analyses are depicted. The results are derived from four independent experiments, respectively. \* $P < .05$ , \*\* $P < .01$  (CGRP stimulation vs medium control; two-tailed unpaired Student's t test or Mann-Whitney U test).

Zusammenfassend, zeigen die Ergebnisse von Laschinger et al., 2020, dass mit dem hier beschriebenen Modell die Anwendung von Precision-cut Liver Slices sowohl aus Wildtyp-Mäusen, als auch aus gentechnisch modifizierten Mäusen gelingt. Weiters unterstreicht die Arbeit das Potential in der Anwendung von humanen PCLS im etablierten System. Auf physiologischer Ebene identifiziert diese Studie den CGRP-RAMP1-Signalweg als Induktor der YAP/TAZ-Expression und -Aktivierung nach akuten und chronischen Leberschaden und unterstützen das Konzept, dass das sensorische Nervensystem ein wichtiges Kontrollelement in der Leberregeneration darstellt.

## V. Diskussion

In der hier vorgestellten Arbeit kann gezeigt werden, dass Precision-cut Liver Slices (PCLS) auch für die Untersuchung von zellautonomer antiviraler Immunität in virusinfizierten Hepatozyten geeignet sind. Die Verwendung von PCLS ermöglicht es die schnelle Induktion der Effektor-Caspasen-Aktivierung nach TNF-Challenge in der Leber *ex vivo* zu verfolgen und intrazelluläre Signalwege wie PLC $\gamma$ - und IP3R-Signaling zu charakterisieren. Somit sind PCLS ein effizientes Tool, um zellautonome Reaktionen in den Leberzellen innerhalb ihres natürlichen Milieus zu untersuchen, welches für ein komplexes Zusammenspiel von Zell-Zell-Kommunikation zur Clearance von virusinfizierten Zellen notwendig ist (Knolle & Gerken, 2000).

Der Nachweis einer erhöhten Sensibilisierung von Hepatozyten für Todessignale nach einer viralen Infektion hat einen neuen Aspekt der Immunüberwachung gegen Virusinfektionen in der Leber aufgezeigt. Effektormoleküle wie TNF, die von aktivierten T-Zellen, Makrophagen oder NK-Zellen in der Leber freigesetzt werden (Schwabe & Brenner, 2006) induzieren selektiv Apoptose in virusinfizierten Hepatozyten. Während die pleiotropen Effekte von TNF bei der Leberschädigung vorwiegend hin auf ihre Folgen z.B. Leberzirrhose (Yang & Seki, 2015) untersucht wurden, ist viel weniger über die Rolle von TNF bei der Eliminierung virusinfizierter Zellen aus der Leber bekannt. Die Leber ist Ziel von hepatotropen Viren wie bspw. dem Hepatitis-B-Virus und dem Hepatitis-C-Virus oder auch von Viren mit systemischer Verbreitung wie dem Influenzavirus und Sars-CoV-2 (Iannacone & Guidotti, 2021; Polakos et al., 2006; Y. Wang et al., 2020). Während für die Untersuchung dieser Viren *in vitro*-Infektionsmodelle etabliert wurden und Virus-Wirtszell-Interaktionen intensiv untersucht wurden, werden die Mechanismen, die der Hepatozyten-intrinsischen Regulation der Zelltod-Signalgebung zugrunde liegen, *in vitro* schwer zu untersuchen sein. Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass PCLS aus virusinfizierten Lebern als Modellsystem für die Untersuchung von Hepatozyten-intrinsischen Regulationen des Zelltods genutzt werden können und die Reaktion von Hepatozyten auf TNF *in vivo* getreu widerspiegelt. Somit können PCLS ein geeignetes *ex vivo*-Modell sein, um die Mechanismen der zellautonomen Immunität in Leberzellen zu untersuchen. Weiters konnte gezeigt werden, dass PCLS durch hochauflösende Respirometrie auch

hinsichtlich Metabolismus untersucht werden können und Fragestellungen zur bioenergetischen Aktivität bei virusinfizierten PCLS beantwortet werden können.

Darüberhinaus zeigt die Arbeit das Potential für die Übertragung von Ergebnissen aus präklinischen Modellsystemen auf menschliches Gewebe. Humane PCLS als auch PCLS aus transgenen Knockout-Mäusen zeigen das Potential des hier etablierten Modells zur Untersuchung von Leberregeneration und geben neue Hinweise bei Untersuchungen des CGRP-RAMP1-Signalweges nach partieller Hepatektomie (Laschinger et al., 2020). PCLS, die aus Lebergewebe von Patienten mit Lebererkrankungen wie viraler Hepatitis, alkoholischer oder nicht-alkoholischer Steatohepatitis und Leberfibrose oder -zirrhose erzeugt werden, können helfen, die zellautonome Immunität in menschlichen Leberzellen unter Krankheitsbedingungen zu charakterisieren und zu einem molekularen Verständnis von Zytokin-induzierter Schädigung des erkrankten Lebergewebes beitragen.

## 1. Viabilität von Precision-cut Liver Slices

Eine optimale Viabilität von Precision-cut Liver Slices (PCLS) ist die Grundvoraussetzung für die spätere Anwendung der Methode. Die Viabilität von PCLS wird häufig durch leberspezifische Enzyme wie beispielsweise der Alaninaminotransferase (ALAT) oder über die Bestimmung der Laktat-Dehydrogenase, des ATP Gehalts, Protein-Synthese oder über einen MTT-Test evaluiert. Diese Parameter geben Auskunft über die Physiologie von PCLS (Robyn L. Fisher et al., 1995; L. Fisher, Judith, Paul, & Klaus, 2001).

Der technische Versuchsaufbau war für das experimentelle Setting ausreichend, da für die Kultivierung von Gewebeschnitten bis zu 24 Stunden nahezu jedes Inkubationssystem verwendet werden kann, solange bestimmte Voraussetzungen gegeben sind. Dabei ist es wichtig, dass das Inkubationssystem nicht statisch ist, sondern das Medium durch Schütteln, Schaukeln oder Perfusion bewegt wird, um ein Mischen und somit eine optimale Verfügbarkeit von Medium, Sauerstoff und Substraten an der Schnittfläche zu ermöglichen (L. Fisher et al., 2001; Olinga et al., 1997; Schumacher et al., 2007). Dieser Voraussetzung konnte in der beschriebenen Methode eine programmierbare Schüttelplatte gerecht werden.

Die Schnittdicke spielt bei der Viabilität von PCLS eine wichtige Rolle. Der Grund dafür liegt vor allem bei der Diffusion von Nährstoffen und Sauerstoff. So könnte bei einer Schnittdicke von mehr als 400  $\mu\text{m}$  das Zentrum des Schnittes nekrotisieren, da die Distanz für die Diffusion von Nährstoffen und Sauerstoff bis ins Zentrum zu lange wäre. Nekrose als Challenge hinsichtlich Viabilität wird vor allem bei der längeren Inkubation von PCLS relevant (Kasper et al., 2005; Starokozhko et al., 2015). Ist der Schnitt zu dünn (unter 100  $\mu\text{m}$ ) ist das Verhältnis von beschädigten Zellen, die durch den Schneideprozess anfallen und gesunden Zellen zu hoch (de Graaf et al., 2010). Laut den Untersuchungen von de Graaf et. al (2010) wird eine Schnittdicke zwischen 100 und 400  $\mu\text{m}$  empfohlen. Bei der Etablierung des hier beschriebenen Modells wurde eine Schnittdicke von 300  $\mu\text{m}$  angestrebt, da diese technisch gut umsetzbar und auch gut reproduziert werden konnte. In den histologischen Untersuchungen von murinen und humanen PCLS zeigten sich keine nekrotischen Areale.

Als Kulturmedium sollte ein reichhaltiges Medium, wie zum Beispiel Williams Medium E (WME) gewählt werden. Für Schnittkulturmodelle unterschiedlicher Organe werden

Waymouth's Medium (L. Fisher et al., 2001), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Vickers et al., 2004) oder Williams Medium E (Toutain et al., 1998; van de Bovenkamp, Groothuis, Meijer, Slooff, & Olinga, 2006; van de Kerkhof, de Graaf, de Jager, & Groothuis, 2007) erfolgreich eingesetzt. Dexamethasone, Insulin und epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) werden teilweise zum Medium dazugegeben.

Für die Inkubation von Schnittkulturen von mehr als 48 Stunden wird die Zugabe von fetalen Kälberserum (FCS) empfohlen. Dabei sollte beachtet werden, dass FCS Enzyme enthält und auch enthaltende Plasmaproteine untersuchte Substanzen (z.B. Medikamente) binden kann. Die Konzentration von FCS beträgt für gewöhnlich 5 – 10 % (L. Fisher et al., 2001; Umachandran & Ioannides, 2006; Vickers et al., 2004). Eine Zugabe von Antibiotika wird vor allem bei Langzeitinkubationen empfohlen. Bei Precision-cut Liver Slices sollte die Hepatotoxizität gewisser Antibiotika berücksichtigt werden. In dem hier beschriebenen Model wurde aufgrund der kurzen Inkubationszeit auf FCS und Antibiotika verzichtet.

Bei der Inkubation von PCLS in WME zusammen mit FCS und DMSO, welches auch dem primären Hepatozyten Medium (PHM) entspricht, zeigte sich unerwarteterweise eine Schädigung der Plasmamembran sowohl in murinen als auch in humanen PCLS. Das in PHM enthaltene DMSO könnte dabei für PCLS toxisch sein. Diese Toxizität von DMSO zeigte sich auch mit einer Erhöhung der Caspase 3 Aktivität bei der Inkubation von PCLS in DMSO gelösten Ciclosporin A (CsA) als auch in der DMSO-Kontrollgruppe (Daten nicht gezeigt).

Williams Medium E mit L-Glutamine und 2.24 g/L NaHCO<sub>3</sub> ist ein Medium, dass Hepatozyten alle notwendigen Agenzien für die Inkubation zur Verfügung stellt. Zur Vereinfachung des Inkubationsmediums, wurde auch die Verwendung ausschließlich von PBS angedacht. Dafür wurde die Viabilität von PCLS während der Inkubation mit PBS gemessen. Im Vergleich zu WME wurde aber eine erhöhte Schädigung der Plasmamembran, durch die Messung der Laktat-Dehydrogenase im Inkubationsmedium nachgewiesen.

Neben der metabolischen Viabilität spielt auch das strukturelle Überleben der Zelle eine wichtige Rolle. Bei der Untersuchung der Laktat-Dehydrogenase-Ausschüttung (LDH) von Leberschnitten während einer Inkubationszeit von 2h konnte kein signifikanter Anstieg von LDH im Inkubationsmedium verzeichnet werden. LDH wird bei einer Schädigung der Plasmamembran freigesetzt und in das Inkubationsmedium freigesetzt (Chan et al., 2013). Die Messung von LDH zur Überprüfung der Viabilität

kann aufgrund der kurzen Halbwertszeit von 9 Stunden nur für einen kurzen Untersuchungszeitraum eingesetzt werden (Riss, Niles, Moravec, Karassina, & Vidugiriene, 2004). Jedoch kann davon ausgegangen werden, dass die Halbwertszeit in den hier vorgestellten Experimenten mit LDH-Messung keine Rolle gespielt hat.

Interessanterweise kommt es während der Inkubation zu einem Anstieg der Syntheseleistung bei gesunden, nicht infizierten Precision-cut Liver Slices, gemessen mithilfe eines ATP Assays. Diese Ergebnisse könnten mit Überlegungen übereinstimmen, dass die ATP-Synthese von PCLS aufgrund der vorherigen Kältekonservierung und damit unmittelbar nach dem Schneidevorgang niedrig sein kann und während der Inkubation zunimmt (de Graaf et al., 2010). Um einen Zellschaden während der Herstellung von PCLS entgegenzuwirken, wird durch die Kühlung der Metabolismus entsprechend gedrosselt (Olthof, Reiniers, Dirkes, Gulik, & Golen, 2016). Die Atmungskette und somit die ATP-Bildung sind temperaturabhängig und steigen durch die Inkubation bei 37 °C wieder an (Dufour, Rousse, Canioni, & Diolez, 1996). Ein solcher Anstieg von ATP, wenn auch langsamer, wurde in Studien zur Langzeitinkubation von Leberschnitten (bis zu 24 Stunden und mehr) beobachtet (Starokozhko et al., 2017; Vanhulle et al., 2001). Im Allgemeinen signalisiert dieser Anstieg gute Inkubationsbedingungen und spricht für eine ausreichende Viabilität von PCLS bei der Inkubation mit der hier vorgestellten Methode. Es liegen Studien vor, die nach der Herstellung von Precision-cut Liver Slices die Schnitte im Inkubator für unterschiedliche Zeiten regenerieren lassen und dann mit dem Experiment starten (de Graaf et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde nach dem Transfer der Schnitte in den Inkubator ehestmöglich mit den jeweiligen Experimenten gestartet. Inwiefern der direkte Versuchsbeginn gegenüber einer Präinkubation Einfluss auf die nachfolgenden Untersuchungen gehabt hätte wurde nicht untersucht. Auch wenn die Syntheseleistung von PCLS im Verlauf angestiegen sind, spielt dies in den Untersuchungen der nicht-kanonischen CD8 T-Zell-Effektorfunktion und TNF vermittelten Zelltod vermutlich eine untergeordnete Rolle. Eine schnelle Erhöhung der ATP-Produktion durch eine erhöhte Stoffwechselaktivität als Reaktion auf mäßigen Zellstress durch unzureichende Inkubationsbedingungen wurde als unwahrscheinlich gewertet.

## 2. TNF induziert Zelltod in virusinfizierten Precision-cut Liver Slices

Bei der Bekämpfung von Viren in virusinfizierten Zellen der Leber, spielen virusspezifische CD8-positive zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) eine wichtige Rolle. Dabei kann die Eliminierung von Viren durch eine zytotoxische Effektorfunktion mit direktem Zellkontakt von CTL mit der virusinfizierten Zelle nach Antigenpräsentation erfolgen (Bossi et al., 2002). Daneben existiert eine nicht-kanonische zytotoxische Effektorfunktion, initiiert durch Kreuzpräsentation viraler Antigene durch LSEC mit Aktivierung von CTL und anschließender Ausschüttung von Tumornekrosefaktor (TNF). Nach TNF-Ausschüttung kommt es zum Zelltod, spezifisch in virusinfizierten Hepatozyten, nicht aber in gesunden Leberzellen (Wohlleber et al., 2012).

Die beschriebene nicht-kanonische Effektorfunktion wurde bislang nur in *in vivo*-Experimenten ausreichend untersucht. Kürzlich konnte dieser Effekt auch *in vitro* an isolierten Hepatozyten nachgewiesen werden (Dr. Dirk Wohlleber und Annika Schneider, nicht publizierte Daten). Auch an virusinfizierten primären humanen Hepatozyten konnte eine Apoptoseinduktion nach TNF-Challenge gezeigt werden (Lampl et al., 2020). Diese Ergebnisse an isolierten Hepatozyten wurden mithilfe einer *Real Time Cell Analysis* (Xcelligence) durch Impedanzmessung generiert und konnten den Zelltod jedoch erst nach 4-5 Stunden nach TNF-Gabe darstellen. Bestrebungen diesen Effekt *in vitro* mit isolierten infizierten Hepatozyten in der Frühphase (innerhalb einer Stunde) nachzuweisen und damit Signalwege zu einem frühen Zeitpunkt mit der Anwendung von Inhibitoren zu untersuchen, sind bislang gescheitert (Dr. Dirk Wohlleber, nicht publizierte Daten). Dies könnte an der fehlenden Mikroarchitektur von isolierten Hepatozyten und fehlenden dreidimensionalen direkten Zell-Zell-Kontakten, die vor allem bei dem für diesen Effekt wichtigem Calcium-Signaling eine entscheidende Rolle spielen könnte. Bei PCLS bleiben diese dreidimensionalen Zell-Zell-Kontakte erhalten.

In virusinfizierten Hepatozyten kommt es nach der Bindung von TNF an den TNF-Rezeptor zu einer Freisetzung von Calcium-Ionen ( $Ca_{2+}$ ) aus dem ER (Marchant & Taylor, 1997). Die Aufnahme von freien  $Ca_{2+}$  in den Mitochondrien führt zu einer mitochondrialen Permeabilitätssteigerung (mPT) und anschließender Cytochrom C Freisetzung mit Aktivierung der Initiator Caspase 9 und weiterer Aktivierung der



Effektor Caspase 3 (Rasola & Bernardi, 2011; Szalai et al., 1999). Durch die erhaltene Mikroarchitektur bei PCLS kann dieses Calcium-Signaling *ex vivo* weiterhin stattfinden und womöglich der Grund für die Apoptose-Induktion nach TNF-Challenge in virusinfizierten PCLS nicht aber in isolierten virusinfizierten Hepatozyten zu einem frühen Zeitpunkt sein. Die von Wohlleber et. al (2012) generierten *in vivo* Ergebnisse zur nicht-kanonischen CD8 T-Zell-Effektorfunktion könnten mit dem hier beschriebenen Model noch weiter untersucht werden. So könnten Precision-cut Liver Slices zusätzlich von Knockout-Mäusen, wie beispielsweise TNFR-Knockout-Mäusen angefertigt werden.

Viele Funktionen der Hepatozyten und Reaktionen auf toxische Verbindungen hängen stark von den Wechselwirkungen mit ihrer natürlichen Matrix ab. Dabei ist die dreidimensionale Zell-Zell-Kommunikation äußerst wichtig. Bei Virusinfektionen der Leber wird ein komplexes Zusammenspiel dieser Zell-Zell-Kommunikation eingeleitet, um die Immunüberwachung durch virusspezifische CD8-positive zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) sowie die Clearance virusinfizierter Zellen zu ermöglichen (Knolle & Gerken, 2000). Diese dreidimensionale Zell-Zell-Kommunikation sowie die Zellpolarität von Hepatozyten bleibt bei Precision-cut liver slices erhalten. Im Gegensatz dazu, verlieren Hepatozyten nach der Isolation ihre anatomische Polarität (Groothuis, Hulstaert, Kalicharan, & Hardonk, 1981). Als weiterer Vorteil von PCLS gegenüber isolierten Hepatozyten, ist der fehlende Einfluss von potenziell schädlichen proteolytischen Enzymen, die während des Isolierungsverfahrens aktiviert werden.

### 3. Precision-cut Liver Slices zur Untersuchung von zellautonomer antiviraler Immunität in infizierten Hepatozyten

Mit dem hier etablierten Modell besteht die Möglichkeit die frühen Vorgänge der zellautonomen antiviralen Immunität von virusinfizierten Hepatozyten zu untersuchen, wie beispielsweise die Rolle von TNF-induzierter Bildung von ROS durch die membranständigen NOX2 NADPH-Oxidase unter der Anwendung von Inhibitoren.

Flavonoide, wie Luteolin, sind wichtige natürliche Antioxidantien und kommen in vielen Pflanzenarten vor (Imran et al., 2019). Vor allem Luteolin bringt unter den Antioxidantien eine gute antioxidante Kapazität mit (Birt, Hendrich, & Wang, 2001) und fungiert als ROS-Inhibitor. Hepatozyten besitzen die NOX2 NADPH-Oxidase (Reinehr, Becker, Eberle, Grether-Beck, & Haussinger, 2005). Die Bindung von TNF an den TNFR I führt zu einer Aktivierung der membranständigen NOX2 NADPH-Oxidase und damit zur Bildung von *reactive oxygen species* (ROS) (Yazdanpanah et al., 2009). Durch die Anwendung von Luteolin konnte nach TNF-Gabe in virusinfizierten PCLS die Caspase 3-Aktivität deutlich reduziert werden. Passend dazu, konnte bei *in vivo* Experimenten in C57Bl/6 – Mäusen nach TNF-Gabe und gleichzeitiger Gabe des ROS-Inhibitors Luteolin eine starke Reduktion der Alanin-Aminotransferase (ALT) im Blut gezeigt werden (Gärtner, 2011 und Dr. Dirk Wohlleber, nicht publizierte Daten). Die ALT-Aktivität stellt dabei einen klinischen Parameter für Leberzellschädigung dar.

ROS spielen bei viralen Infektionen der Leber eine wichtige Rolle. Studien konnten zeigen, dass virale Infektionen der Leber mit oxidativem Stress assoziiert sind (Kroemer, Galluzzi, & Brenner, 2007; Loguercio & Federico, 2003; Okuda et al., 2002). In unseren Versuchen konnte bei virusinfizierten PCLS eine erhöhte Caspase-Aktivität gegenüber nicht infizierten PCLS gezeigt werden. Dies könnte auf den oxidativen Stress von PCLS durch die Virusinfektion zurückzuführen sein. Die Rolle von ROS bei TNF-induzierten Zelltod virusinfizierter Hepatozyten ist nicht vollständig geklärt. Als ROS-Quellen kommen sowohl Mitochondrien, als auch das endoplasmatische Retikulum (ER) oder Peroxisomen in Frage (Brown & Borutaite, 2012; Hill et al., 2012). Inflammatorische Zellen der Leber könnten ebenso ROS produzieren (Jaeschke, Ho, Fisher, Lawson, & Farhood, 1999). Zusammenfassend ist ROS für die TNF-vermittelte Apoptose entscheidend und kann dabei über eine verminderte mitochondriale Belastbarkeit eine Induktion der intrinsischen Apoptose auslösen (Lampl et al., 2020).

Auch der weitere Signalweg nach Aktivierung der Phospholipase C durch ROS (siehe **Abbildung 3**) kann durch die Anwendung der Inhibitoren Edelfosin und Xestospongin C weiter untersucht werden (siehe **Abbildung 11**) und gibt Hinweise auf eine Reduktion von Apoptose nach TNF-induzierter ROS-Bildung.

Zusammenfassend kann mit dem hier etablierten System gezeigt werden, dass sich durch die Anwendung von Inhibitoren bei PCLS die Hepatozyten-intrinsische Regulation der Zelltod-Signalgebung im Rahmen zellautonomer Vorgänge untersuchen lassen. Es ist an dieser Stelle auch wichtig darauf hinzuweisen, dass mithilfe von PCLS diese Signale bereits in frühen Phasen von Zell-Aktivierung und Zelltod untersucht werden können und unterstreichen den Einsatz von PCLS als vielseitiges *ex vivo* Tool.

#### 4. Mitochondriale Fitness in Precision-cut Liver Slices

Mitochondriale Fitness ist ein häufiger Diskussionspunkt bei der Thematisierung von Virusinfektionen. Um die Rolle der Mitochondrien in virusinfizierten Hepatozyten zu verstehen, sind auch Grundkenntnisse der mitochondrialen Atmung und der bioenergetischen Funktionen erforderlich. Unsere Ergebnisse deuten auf eine erhaltene Funktionalität der Mitochondrien nach einer Virusinfektion hin. Ein Unterschied in den mitochondrialen bioenergetischen Funktionen zwischen virusinfizierten Precision-cut liver slices und gesunden nicht infizierten Schnitten konnte nicht nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen, die einen Hinweis auf die Ursache einer reduzierten Belastbarkeit von Mitochondrien nach Virusinfektion in Hepatozyten liefern können, wurde nicht durchgeführt. Jedoch konnte anhand der Ergebnisse gezeigt werden, dass eine virale Infektion den Energiemetabolismus von Lebermitochondrien nicht verändert. Diese Beobachtungen gehen auch mit Ergebnissen am isolierten Lebermitochondrien nach viraler Infektion einher (Lampl et al., 2020).

Aus technischer Sicht kann die Messung der OCR von PCLS mithilfe eines O<sub>2</sub>k-Respirometers diskutiert werden. Die Messung der OCR in den hier beschriebenen Ergebnissen wurde mit einem O<sub>2</sub>k-Respirometer von Oroboros Instruments durchgeführt. Vergleichbare Daten zur Messung der oxidativen Phosphorylierung bei PCLS scheinen in der Literatur nicht auf. Obwohl die Möglichkeit

besteht mit dem O<sub>2</sub>k-Respirometer Messungen an Gewebeschnitten durchzuführen, werden Messungen häufiger mit Gewebehomogenat oder permeabilisierten Gewebe durchgeführt (Makrecka-Kuka, Krumschnabel, & Gnaiger, 2015). Jedoch könnte eine Gewebehomogenisierung die äußere Mitochondrienmembran verletzen und die mitochondriale Funktion beeinträchtigen. Ein solcher Einfluss wird auch bei mitochondrialen Isolationsverfahren der Skelettmuskulatur diskutiert (Picard, Taivassalo, Gouspillou, & Hepple, 2011; Picard, Taivassalo, Ritchie, et al., 2011).

Die Isolation von Mitochondrien aus murinen Lebergewebe hingegen ist gut etabliert (Schmitt, Eberhagen, Weber, Aichler, & Zischka, 2015; Schmitt et al., 2013). Ein Vergleich zwischen der Messung von PCLS und permeabilisierten PCLS wurde nicht durchgeführt.

Die Messung von Schnittkulturen mit dem O<sub>2</sub>k-Respirometer kann aber nach den hier vorgelegten Untersuchungen uneingeschränkt erfolgen. Sollten die Gewebeproben zu klein sein und somit ein einzelner Schnitt nicht detektiert werden können, kann auch ein *Pooling* von Schnitten erfolgen.

## 5. Übertragung der SOPs auf humane Precision-cut Liver Slices

Es besteht ein dringender Bedarf an zuverlässigen Systemen, um die Pathogenese von Lebererkrankungen wie Virushepatitis, nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH), Tumorerkrankungen, Fibrose und alkoholbedingte Leberzirrhose zu verstehen.

Die derzeit verwendeten *in vitro*-Zellkulturmodelle und *in vivo*-Tiermodelle können die komplexe Pathogenese von Leberschäden und Krankheitsprogression beim Menschen nicht vollständig nachahmen. Insbesondere bei der Entwicklung von Fibrose. Dies behindert im weiteren Verlauf auch die Entwicklung prognostischer und diagnostischer Biomarker. Des Weiteren können vorklinische Tests potenzieller therapeutischer Zielstrukturen in Tiermodellen zur Identifizierung von Molekülen führen, die nicht immer Wirksamkeit zeigen oder eventuell auch toxische Ereignisse beim Menschen hervorrufen (Reese et al., 2016).

Die Immunologie betreffend, zeigen jüngste Veröffentlichungen, dass spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPF) in der Maushaltung weitreichende und unerwartete Auswirkungen auf das Immunsystem der Mäuse haben kann

(Beura et al., 2016; Reese et al., 2016). Menschen hingegen, sind im Laufe ihres Lebens einer Vielzahl von akuten und chronischen Krankheitserregern ausgesetzt und infiziert. Diese Erreger-bedingte Selektion hat das Immunsystem der Menschen geprägt (Tao & Reese, 2017). Zusammenfassend bestehen signifikante Unterschiede zwischen den Immunsystemen von Mäusen und Menschen (Mestas & Hughes, 2004) und umso wichtiger ist es in Zukunft humane Precision-cut Liver Slices in den Fokus zu rücken.

Bei der Arbeit mit humanen PCLS gibt es jedoch auch Limitationen. Der Zugang zu frischem humanen Lebergewebe ist einer der Hauptlimitation bei der Anwendung von humanen Precision-cut Liver Slices. Die Herstellung von PCLS erfordert schon im Vorfeld eine gute Koordinierung und Kommunikation zwischen den Beteiligten, einschließlich Chirurgen, Histopathologen, Krankenschwestern und wissenschaftlichen Mitarbeitern. Darüber hinaus ist das „gesunde“ Gewebe, das reseziert wurde, nicht wirklich gesund, da es unvermeidbar aus dem distalen Teil einer erkrankten Leber stammt. Somit ist zu bedenken, dass die Viabilität und Funktionalität stark abhängig von der Qualität des Spenderorgans ist (R. L. Fisher, Gandolfi, & Brendel, 2001; Olinga, Merema, Hof, de Jong, et al., 1998). Dies kann zu einer Variabilität zwischen Experimenten und Testpersonen führen. Gleiches gilt für die Verwendung von humanen PCLS die aus zirrhotischer Leber oder hepatozellulärem Karzinom angefertigt wurden, da diese Patienten vor der Operation häufig eine chemotherapeutische Behandlung oder ablative Strategien durchlaufen haben.

Weiteres ist zu beachten, dass die Wahl des Inkubationsmediums bei humanen Schnittkulturmodellen nicht evidenzbasiert ist. In der Literatur wird am häufigsten die Verwendung von Williams Medium E mit Glucose beschrieben. Bei längerer Inkubationszeit wird die Zugabe von Antibiotika empfohlen. Bei einer Inkubationszeit von mehr als 48 Stunden könnte die Hinzugabe von Insulin (30 nM), Glukagon (100 nM), Kortikosteroide (1mM), epidermaler Wachstumsfaktor (1 nM ) und/oder 5% fetales Kälberserum (FCS) für die Verbesserung der Viabilität vom Vorteil sein (Vickers et al., 2004).

Sollte es möglich sein mehr PCLS von humanen Gewebe herzustellen als an einem Tag experimentell verarbeitet werden können, so können PCLS gekühlt aufbewahrt werden. Gesunde humane PCLS können vor einer Inkubation in eiskalten

Organkonservierungslösung bis zu 18 Stunden ohne Verlust der Viabilität und Funktionalität konserviert werden (Olinga, Merema, Hof, De Jager, et al., 1998).

Auch mit Hilfe von Kryokonservierung versucht man, das selten verfügbare humane Gewebe effizient zu nutzen, jedoch scheint das Überleben von PCLS auf 3 – 4 Stunden nach dem Auftauen begrenzt zu sein (de Graaf et al., 2007; de Graaf & Koster, 2003; de Kanter et al., 1998; R. L. Fisher et al., 1993). Arbeitsgruppen sind aktuell daran interessiert, die Lebensfähigkeit der Schnitte nach dem Auftauen zu verbessern.

Bei experimenteller Arbeit mit humaner Leber ist vor dem Hintergrund einer möglichen viralen Infektion stets auf den Eigenschutz zu achten. Daher empfiehlt es sich entsprechende Schutzkleidung insbesondere eine Schutzbrille und Mundschutz zu tragen. Zusätzlich sollte am Ende des Experiments auf eine ausreichende Desinfektion der verwendeten Geräte geachtet werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das hier etablierte Modell sowohl für murines als auch für humanes Gewebe anwendbar ist. Bei der Übertragung der SOPs für humanes Gewebe konnte die Viabilität der Gewebeschnitte erhalten bleiben. Dies zeigte sich nicht nur in den Zeitkinetik-Messungen der Caspase 3 Aktivität und LDH, sondern auch in der immunhistochemischen Färbung für gespaltene Caspase 3. Die Untersuchungen zeigen aber auch, dass das hier etablierte Modell für eine längere Inkubation von PCLS nicht geeignet ist. Es kommt bei einer längeren Inkubation der Schnitte von 24 Stunden zu einem Anstieg der Caspase 3 Aktivität, die auch in der immunhistochemischen Färbung detektierbar ist. Als nächsten Schritt wäre es notwendig die Langzeitinkubation humaner PCLS zu verbessern, um eine *ex vivo*-Infektion humaner PCLS mit einem Adenovirus durchzuführen und damit die nicht-kanonische T-Zell-Effektorfunktion auch an humanen PCLS zu untersuchen.

Ebenso diskutiert werden kann eine Schädigung der Zellmembran durch DMSO. Identisch zu murinen PCLS kann das in PHM enthaltene DMSO zu einer Schädigung der Zellmembran und erhöhten Freisetzung von LDH in das Inkubationsmedium führen (Cheng, Song, Pas, Meijer, & Han, 2015). Die LDH-Freisetzung in humanen PCLS war höher als in murinen PCLS. Dies könnte mit der geringeren Größe humaner Hepatozyten im Vergleich zu murinen Hepatozyten und folglich größerer Zellzahl mit vermehrter LDH-Freisetzung zu tun haben. Zusätzlich muss auch an eine Vorschädigung der Leber des Patienten sowie der Einfluss der Operation bedacht werden. Der schnelle gekühlte Transport des Leberresektats in Organkonservierungslösung (Custodiol®) vom OP-Saal in das Labor innerhalb von

30 Minuten hatte dabei vermutlich keinen Einfluss, wenn jedoch eine Überprüfung der Transportzeit in Abhängigkeit zur Viabilität des Gewebes nicht überprüft wurde.

Durch die hier vorgestellte Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich murine PCLS gut für die Untersuchung von Signalwegen und die Anwendung von Inhibitoren eignen. Ident dazu konnte gezeigt werden, dass sich auch die hier beschriebenen humanen PCLS gut für Studien zu Signalwegen eignen. So konnte Laschinger et al. (2020) mit den hier etablierten humanen PCLS Untersuchungen des CGRP-RAMP1-Signalweges nach partieller Hepatektomie durchführen.

Zusammenfassend sind humane PCLS ein vielversprechendes *ex vivo*-Tool, auch wenn die Qualität der Schnitte von der Qualität des Spenderorgans anhängig und die Inkubation noch nicht evidenzbasiert ist. Dazu braucht es zukünftig weitere Studien sowie eine sorgfältige Prüfung des Spenderorgans mit Berücksichtigungen eventueller Vormedikation.

## 6. Precision-cut Liver Slices zur Reduktion von Tierversuchen

Das Thema Tierschutz ist präsenter denn je und immer mehr Menschen in unserer Gesellschaft sprechen sich gegen Tierversuche aus. Die Anwendung der „3 R“-Prinzipien im Umgang mit Tierversuchen bilden dabei die Grundlage für Tierschutzpolitik und modernen Forschungsansätzen in der Praxis. Ziel ist es, geplante Tierversuche durch den Einsatz anderer Methoden zu vermeiden, die Anzahl an Versuchstieren zu reduzieren und die Belastungen für die Tiere während eines Experiments so gering wie nur möglich zu halten. Durch die Anwendung der hier beschriebenen Precision-cut Liver Slices kann ein wesentlicher Beitrag zu Reduktion von eingesetzten Tieren (Reduction), zur Minderung der Belastung während eines Experiments (Refinement) und zum Ersatz von Tierversuchen (Replacement) geleistet werden.

Im Rahmen der Arbeit konnte eine Reduktion von Tieren dadurch stattfinden, da aus einer Mausleber eine große Anzahl an PCLS gefertigt werden konnte. Je nach Schnittdicke und Organgröße können bis zu 15 PCLS alleine aus einem Leberlappen der Maus hergestellt werden. Das erhöht einerseits den Probenumfang für das Studiendesign, andererseits bietet es die Möglichkeit mehrere Aktivatoren und

Inhibitoren gleichzeitig zu testen, ohne eine große Anzahl an Versuchstieren zu verwenden. Für die Untersuchung eines Inhibitors, beispielsweise von Luteolin, hätte man pro Experiment *in vivo* mit Versuchs- und Kontrollgruppen bei einer Gruppengröße von 3 Mäusen mit ca. 12 Versuchstieren rechnen müssen. Durch die Anwendung von PCLS konnten rund 12 Versuchstiere auf ein Versuchstier reduziert werden. Auch bei dreimaliger Wiederholung des Versuchsvorhabens entspricht das immer noch einer Reduktion an Versuchstieren von 75 %. Eine weitere Reduktion von Versuchstieren könnte stattfinden, wenn andere Organe desselben Tieres in weiteren Schnittkulturmodellen verwendet werden würden. So könnte gleichzeitig die Herstellung von Precision-cut Intestinal Slices aus dem Darm oder Precision-cut Lung Slices aus der Lunge erfolgen.

Ein Beispiel für eine Minderung der Belastung eines Versuchstieres kann durch die Nutzung des hier etablierten Modells und die Anwendung von Xestospongin C diskutiert werden. Durch die Anwendung von PCLS konnte eine starke Belastung des Tieres durch die systemische Toxizität von Xestospongin C vermieden werden und durch Applikation dieses Inhibitors auf PCLS die entscheidenden Daten für die Untersuchung eines Signalweges generiert werden.

Da bei der hier beschriebenen Methode eine Herstellung sowohl von murinen als auch von humanen PCLS etabliert werden konnte, zeigt dieses System das Potential Tierversuche auch gänzlich zu ersetzen. So kann durch die Herstellung von humanen PCLS aus "Abfallgewebe" nach chirurgischen Resektionen Tierversuche ersetzt und gleichzeitig ein translationaler Beitrag geleistet werden.

Zusammenfassend kann durch die Anwendung von Schnittkulturmodellen unterschiedlicher Organe in der Forschung die Anzahl an Versuchstieren deutlich reduziert werden und stellen eine gute Alternative zu *in vivo* Experimenten dar.



## 7. „Organ in a slice“- Quo vadis?

Durch die Anwendung von Precision-cut Liver Slices in der Forschung, stellt sich natürlich auch die Frage, inwieweit die Anwendung dieser Methode ausgeweitet werden kann, wo die Grenzen, aber vor allem wo die Zukunft liegt. 3D-Zellkulturen wird in den nächsten Jahren vermehrt Anwendung finden und auch die Anzahl an Publikationen mit 3D-Zellkulturen ist in den letzten 20 Jahren bereits stark angestiegen (Jensen & Teng, 2020). Der Trend geht weiterhin Richtung 3D-Zellkultur. Die Vorteile wie das physiologische Milieu oder die erhaltende Mikroarchitektur mit dem Erhalt ortsständiger Zellen und dreidimensionaler Zell-Zell-Kontakte liegen auf der Hand.

Die Grenzen der Modelle liegen vor allem bei der begrenzten Inkubationszeit der Organschnitte. Bislang konnten PCLS über einen Zeitraum von 5 Tagen inkubiert werden (Starokozhko et al., 2017). Eine Inkubation von Leberschnitten über mehrere Tage kann für viele Studien interessant werden. Dies kann einerseits durch die Optimierung der Kulturbedingungen, wie z.B. einer Optimierung des Kulturmediums oder der Inkubation, andererseits aber auch durch das Verlassen von der klassischen Inkubation mit einer Mikrotiterplatte hin zu einer Einbettung der Leber in spezielle Platten, die ein durchfließen des Mediums im Leberschnitten während der Inkubation ermöglichen. Durch die Perfusion von Organschnitten könnte das Problem der Entwicklung einer zentralen Nekrose bei höherer Schnittdicke über 400 µm oder längerer Inkubationszeit gelöst werden und damit die Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen zusätzlich auf anderer Ebene unterstützt werden. Dazu konnte in nicht veröffentlichten Versuchen im Rahmen der Promotionsarbeit eine technische Machbarkeit mit speziellen Perfusionsplatten bereits überprüft und das Potential positiv evaluiert werden. Eventuell müsste in Zukunft auch ein Vorteil einer möglichen Kombination verschiedener Inkubationsmethoden untersucht werden.

Schnittkulturmodelle der Leber, aber auch anderer Organe, werden in Zukunft eine wichtige Rolle in der translationalen Medizin spielen und können dazu beitragen, neue wissenschaftliche Erfindungen und Ansätze von der Laborbank an das Krankenbett zu bringen („from bench to bedside“). Dieser „**Organ in a slice**“ – Ansatz könnte ein wichtiges Instrument in der personalisierten Medizin werden. So könnte aus rezensiertem Tumormaterial Schnitte angefertigt werden, um schnell und effizient das wirksamste Zytostatikum oder die beste Arzneimittelkombination zu bestimmen.

Ein wichtiger Punkt wird sein, die Inkubationsbedingungen immer weiter zu optimieren, um die Schnitte noch besser an die *in vivo* Verhältnisse der Leber heranzuführen. Dies könnte durch die Anwendung von exogenen und endogenen induktiven Stimuli und zirkulierenden Komponenten wie Lymphozyten, angeborene Immunzellen, Chemokine oder Hormonen verbessert werden und damit die Zuverlässigkeit erhöhen.

Die hier beschriebenen humanen PCLS haben ein großes Potential, um eine Schlüsselfunktion in der Translationalen Forschung zu übernehmen und die Herausforderung der zunehmenden Komplexität bei der Translation von Zellkulturen über *in vivo*-Modelle bis hin zur klinischen Anwendung wissenschaftlicher Ansätze anzunehmen. Humane PCLS können dabei zur Charakterisierung der zellautonomen Immunität beim Menschen, insbesondere bei Lebererkrankungen wie Virushepatitis, alkoholische oder nichtalkoholische Steatohepatitis oder beispielsweise zur Untersuchung gentherapeutischer Ansätze genutzt werden.

## 8. Werden Precision-cut Liver Slices bald traditionelle *in vitro* Methoden verdrängen?

Precision-cut Liver Slices stellen ein sehr vielseitiges und valides Modell für die Anwendung in vielen verschiedenen Bereichen wie der Immunologie, Toxikologie, Pharmakologie, Transplantationsforschung uva. dar. Trotz der klaren Vorteile konnten sich Precision-cut Liver Slices noch nicht eine feste Position als *in vitro*-Instrument in der universitären und industriellen Forschung erarbeiten und gut etablierte Systeme wie isolierte Hepatozyten verdrängen. Dies könnte auf unterschiedliche Ursachen zurückzuführen zu sein. Viele Forscher scheinen mit der Einrichtung der Technik für die Herstellung von PCLS und die Inkubation Schwierigkeiten zu haben. Obwohl die Methode relativ einfach erscheint, ist ordnungsgemäßes Arbeiten und Erfahrung im Umgang mit der Technik notwendig, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Durch die lange Erfahrung mit *in vitro*-Systemen wie primären Hepatozyten oder Mikrosomen, fällt die Entscheidung vor allem in der industriellen Forschung schwer, eine neue Technik wie PCLS einzuführen. Ein weiterer Punkt für das erschwerte Durchsetzungsvermögen von PCLS in der Forschung, könnte die aufwendige Vorbereitung sein, da alle Schnitte einzeln zubereitet werden müssen und die

Inkubationstechnik hauptsächlich für 6-well und 12-well Formate etabliert ist. Somit sind Screening-Zwecke, bei denen hohe Durchsatzraten nötig sind, schwer möglich. Ein weiteres Problem für die seltene Anwendung ist die Viabilität und Funktionalität der Schnitte. So ist es in Fachkreisen bekannt, dass die Abnahme des CYP-vermittelten Metabolismus nicht mit der Viabilität der Schnitte korreliert, sondern vielmehr auf das Fehlen von endogenen Stimuli, die eine *de novo* Synthese metabolischer Enzyme triggert. In diesem Zusammenhang wäre es erstrebenswert mehr Bemühungen in die Entwicklung eines Kulturmediums zu stecken, dass die metabolische Aktivität für längere Zeit erhält.

Eine entscheidende Rolle in der Verbreitung der Methode könnte die kommerzielle Verfügbarkeit von PCLS spielen. Im Vergleich zu anderen primären Zellkultursystemen sind PCLS nicht kommerziell verfügbar. Die Entwicklung einer adäquaten Kältekonserverung wäre die Grundvoraussetzung für kommerzielle Verfügbarkeit und somit vermehrte Verwendung im industriellen Setting.

Eine adäquate Kältekonserverung erleichtert auch die Verteilung von selten verfügbaren humanen Gewebe. So kann zwischen der Präparation der Schnitte und Beginn der Experimente ein Zeitintervall von 12 – 24 Stunden für humane Leber und Leber vom Affen abgedeckt werden (R. L. Fisher et al., 1993; Olinga, Merema, Hof, De Jager, et al., 1998).

Die oft umstrittene Kryokonserverung von Schnittkulturen könnte dabei noch einen Schritt weiter gehen und dabei helfen eine Gewebebank von PCLS zu erstellen.

Interessanterweise wird vor allem in der pharmazeutischen Forschung viel Energie in *Tissue Engineering* investiert, um leberähnliche Systeme nach Isolation und Separation von Leberzellen, wieder zu rekonstruieren. Ganz im Gegenteil dazu zeigt die hier beschriebene Etablierung von PCLS, dass ein derartiger Aufwand hinsichtlich *Tissue Engineering* nicht notwendig wäre und mit der Anwendung von PCLS ein valides, physiologisches und kostengünstiges Modell zur Forschung von Erkrankungen im Gewebe zur Verfügung steht.

## VI. Literaturverzeichnis

Alazawi, W., & Knolle, P. A. (2018). Interfering with Kupffer cell replenishment: New insights into liver injury. *J Hepatol*, 68(4), 635-637. doi:10.1016/j.jhep.2018.01.011

Beljaars, L., Olinga, P., Molema, G., de Bleser, P., Geerts, A., Groothuis, G. M., Meijer, D. K., & Poelstra, K. (2001). Characteristics of the hepatic stellate cell-selective carrier mannose 6-phosphate modified albumin (M6P(28)-HSA). *Liver*, 21(5), 320-328. doi:10.1034/j.1600-0676.2001.210504.x

Beura, L. K., Hamilton, S. E., Bi, K., Schenkel, J. M., Odumade, O. A., Casey, K. A., Thompson, E. A., Fraser, K. A., Rosato, P. C., Filali-Mouhim, A., Sekaly, R. P., Jenkins, M. K., Vezys, V., Haining, W. N., Jameson, S. C., & Masopust, D. (2016). Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice. *Nature*, 532(7600), 512-516. doi:10.1038/nature17655

Birt, D. F., Hendrich, S., & Wang, W. (2001). Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther*, 90(2-3), 157-177. doi:10.1016/s0163-7258(01)00137-1

Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J., & Cerretti, D. P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*, 385(6618), 729-733. doi:10.1038/385729a0

Borst, K., Frenz, T., Spanier, J., Tegtmeyer, P. K., Chhatbar, C., Skerra, J., Ghita, L., Namineni, S., Lienenklaus, S., Koster, M., Heikenwaelder, M., Sutter, G., & Kalinke, U. (2018). Type I interferon receptor signaling delays Kupffer cell replenishment during acute fulminant viral hepatitis. *J Hepatol*, 68(4), 682-690. doi:10.1016/j.jhep.2017.11.029

Bossi, G., Trambas, C., Booth, S., Clark, R., Stinchcombe, J., & Griffiths, G. M. (2002). The secretory synapse: the secrets of a serial killer. *Immunol Rev*, 189, 152-160. doi:10.1034/j.1600-065x.2002.18913.x

Brand, M. D., & Nicholls, D. G. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J*, 435(2), 297-312. doi:10.1042/BJ20110162

Brendel, K., Fisher, R. L., Krumdieck, C. L., & Gandolfi, A. J. (1993). Precision-cut rat liver slices in dynamic organ culture for structure-toxicity studies. *In Vitro Biological Systems*, 1.

Brenner, D., Blaser, H., & Mak, T. W. (2015). Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat Rev Immunol*, 15(6), 362-374. doi:10.1038/nri3834

Brown, G. C., & Borutaite, V. (2012). There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells. *Mitochondrion*, 12(1), 1-4. doi:10.1016/j.mito.2011.02.001

- Bull, D. A., Reid, B. B., Connors, R. C., Albanil, A., Stringham, J. C., & Karwande, S. V. (2000). Improved biochemical preservation of heart slices during cold storage. *Int J Surg Investig*, 2(2), 117-123. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12678509>
- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., & Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(9), 3666-3670. doi:10.1073/pnas.72.9.3666
- Caserta, T. M., Smith, A. N., Gultice, A. D., Reedy, M. A., & Brown, T. L. (2003). Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties. *Apoptosis*, 8(4), 345-352. doi:10.1023/a:1024116916932
- Chan, F. K., Luz, N. F., & Moriwaki, K. (2015). Programmed necrosis in the cross talk of cell death and inflammation. *Annu Rev Immunol*, 33, 79-106. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112248
- Chan, F. K., Moriwaki, K., & De Rosa, M. J. (2013). Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods Mol Biol*, 979, 65-70. doi:10.1007/978-1-62703-290-2\_7
- Chance, B., & Williams, G. R. (1955). Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *J Biol Chem*, 217(1), 383-393. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13271402>
- Cheng, C. Y., Song, J., Pas, J., Meijer, L. H., & Han, S. (2015). DMSO induces dehydration near lipid membrane surfaces. *Biophys J*, 109(2), 330-339. doi:10.1016/j.bpj.2015.06.011
- de Graaf, I. A., de Kanter, R., de Jager, M. H., Camacho, R., Langenkamp, E., van de Kerkhof, E. G., & Groothuis, G. M. (2006). Empirical validation of a rat in vitro organ slice model as a tool for in vivo clearance prediction. *Drug Metab Dispos*, 34(4), 591-599. doi:10.1124/dmd.105.006726
- de Graaf, I. A., Draaisma, A. L., Schoeman, O., Fahy, G. M., Groothuis, G. M., & Koster, H. J. (2007). Cryopreservation of rat precision-cut liver and kidney slices by rapid freezing and vitrification. *Cryobiology*, 54(1), 1-12. doi:10.1016/j.cryobiol.2006.09.002
- de Graaf, I. A., & Koster, H. J. (2003). Cryopreservation of precision-cut tissue slices for application in drug metabolism research. *Toxicol In Vitro*, 17(1), 1-17. doi:10.1016/s0887-2333(02)00117-0
- de Graaf, I. A., Olinga, P., de Jager, M. H., Merema, M. T., de Kanter, R., van de Kerkhof, E. G., & Groothuis, G. M. (2010). Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies. *Nat Protoc*, 5(9), 1540-1551. doi:10.1038/nprot.2010.111
- de Kanter, R., Olinga, P., Hof, I., de Jager, M., Verwillegen, W. A., Slooff, M. J., Koster, H. J., Meijer, D. K., & Groothuis, G. M. (1998). A rapid and simple method for cryopreservation of human liver slices. *Xenobiotica*, 28(3), 225-234. doi:10.1080/004982598239533

de Kanter, R., Tuin, A., van de Kerkhof, E., Martignoni, M., Draaisma, A. L., de Jager, M. H., de Graaf, I. A., Meijer, D. K., & Groothuis, G. M. (2005). A new technique for preparing precision-cut slices from small intestine and colon for drug biotransformation studies. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 51(1), 65-72. doi:10.1016/j.vascn.2004.07.007

De Smet, P., Parys, J. B., Callewaert, G., Weidema, A. F., Hill, E., De Smedt, H., Erneux, C., Sorrentino, V., & Missiaen, L. (1999). Xestospongins C is an equally potent inhibitor of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and the endoplasmic-reticulum Ca(2+) pumps. *Cell Calcium*, 26(1-2), 9-13. doi:10.1054/ceca.1999.0047

Ding, W. X., & Yin, X. M. (2004). Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury. *J Cell Mol Med*, 8(4), 445-454. doi:10.1111/j.1582-4934.2004.tb00469.x

*Duale Reihe Innere Medizin*. (2018). (4. Auflage ed.): Keikawus Arastéh, Hanns-Wolf Baenkler, Christiane Bieber, Roland Brandt, Tushar Thomas Chatterjee

Dufour, S., Rousse, N., Canioni, P., & Diolez, P. (1996). Top-down control analysis of temperature effect on oxidative phosphorylation. *Biochem J*, 314 ( Pt 3), 743-751. doi:10.1042/bj3140743

Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F., & Yang, L. (2014). Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol*, 12(4), 207-218. doi:10.1089/adt.2014.573

Elferink, M. G., Olinga, P., Draaisma, A. L., Merema, M. T., Bauerschmidt, S., Polman, J., Schoonen, W. G., & Groothuis, G. M. (2008). Microarray analysis in rat liver slices correctly predicts in vivo hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 229(3), 300-309. doi:10.1016/j.taap.2008.01.037

Elferink, M. G., Olinga, P., Draaisma, A. L., Merema, M. T., Faber, K. N., Slooff, M. J., Meijer, D. K., & Groothuis, G. M. (2004). LPS-induced downregulation of MRP2 and BSEP in human liver is due to a posttranscriptional process. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 287(5), G1008-1016. doi:10.1152/ajpgi.00071.2004

Fisher, R. L., Gandolfi, A. J., & Brendel, K. (2001). Human liver quality is a dominant factor in the outcome of in vitro studies. *Cell Biol Toxicol*, 17(3), 179-189. doi:10.1023/a:1011944531257

Fisher, R. L., Hasal, S. J., Sanuik, J. T., Scott, K. S., Gandolfi, A. J., & Brendel, K. (1993). Cold- and cryopreservation of human liver and kidney slices. *Cryobiology*, 30(3), 250-261. doi:10.1006/cryo.1993.1023

Fisher, R. L., Shaughnessy, R. P., Jenkins, P. M., Austin, M. L., Roth, G. L., Gandolfi, A. J., & Brendel, K. (1995). Dynamic Organ Culture is Superior to Multiwell Plate Culture for Maintaining Precision-Cut Tissue Slices: Optimization of Tissue Slice Culture, Part 1. *Toxicology Methods*, 5(2), 99-113. doi:10.3109/15376519509045905

Galluzzi, L., Kepp, O., & Kroemer, G. (2012). Mitochondria: master regulators of danger signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(12), 780-788. doi:10.1038/nrm3479

- Gebhardt, R. (1992). Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacol Ther*, 53(3), 275-354. doi:10.1016/0163-7258(92)90055-5
- Gingell, J. J., Hendrikse, E. R., & Hay, D. L. (2019). New Insights into the Regulation of CGRP-Family Receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 40(1), 71-83. doi:10.1016/j.tips.2018.11.005
- Gnaiger, E. (2014). Mitochondrial Pathways and Respiratory Control: An Introduction to OXPHOS Analysis. *OROBOROS Instruments Corp.*
- Gola, A., Dorrington, M. G., Speranza, E., Sala, C., Shih, R. M., Radtke, A. J., Wong, H. S., Baptista, A. P., Hernandez, J. M., Castellani, G., Fraser, I. D. C., & Germain, R. N. (2021). Commensal-driven immune zonation of the liver promotes host defence. *Nature*, 589(7840), 131-136. doi:10.1038/s41586-020-2977-2
- Graaf, I. A., Groothuis, G. M., & Olinga, P. (2007). Precision-cut tissue slices as a tool to predict metabolism of novel drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 3(6), 879-898. doi:10.1517/17425255.3.6.879
- Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K., & Scheurich, P. (1995). The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*, 83(5), 793-802. doi:10.1016/0092-8674(95)90192-2
- Groothuis, G. M., Hulstaert, C. E., Kalicharan, D., & Hardonk, M. J. (1981). Plasma membrane specialization and intracellular polarity of freshly isolated rat hepatocytes. *Eur J Cell Biol*, 26(1), 43-51. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6276181>
- Guo, Y., Wang, H., & Zhang, C. (2007). Establishment of rat precision-cut fibrotic liver slice technique and its application in verapamil metabolism. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 34(5-6), 406-413. doi:10.1111/j.1440-1681.2007.04582.x
- Hadi, M., Westra, I. M., Starokozhko, V., Dragovic, S., Merema, M. T., & Groothuis, G. M. (2013). Human precision-cut liver slices as an ex vivo model to study idiosyncratic drug-induced liver injury. *Chem Res Toxicol*, 26(5), 710-720. doi:10.1021/tx300519p
- Hagens, W. I., Olinga, P., Meijer, D. K., Groothuis, G. M., Beljaars, L., & Poelstra, K. (2006). Gliotoxin non-selectively induces apoptosis in fibrotic and normal livers. *Liver Int*, 26(2), 232-239. doi:10.1111/j.1478-3231.2005.01212.x
- Hill, B. G., Benavides, G. A., Lancaster, J. R., Jr., Ballinger, S., Dell'Italia, L., Jianhua, Z., & Darley-Usmar, V. M. (2012). Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. *Biol Chem*, 393(12), 1485-1512. doi:10.1515/hsz-2012-0198
- Hoffmann, P., Skibinski, G., & James, K. (1995). Organ culture of human lymphoid tissue. I. Characteristics of the system. *J Immunol Methods*, 179(1), 37-49. doi:10.1016/0022-1759(94)00268-2

Holzmann, B. (2013). Modulation of immune responses by the neuropeptide CGRP. *Amino Acids*, 45(1), 1-7. doi:10.1007/s00726-011-1161-2

Huttemann, M., Pecina, P., Rainbolt, M., Sanderson, T. H., Kagan, V. E., Samavati, L., Doan, J. W., & Lee, I. (2011). The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: From respiration to apoptosis. *Mitochondrion*, 11(3), 369-381. doi:10.1016/j.mito.2011.01.010

Iannacone, M., & Guidotti, L. G. (2021). Immunobiology and pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Nat Rev Immunol*. doi:10.1038/s41577-021-00549-4

Imran, M., Rauf, A., Abu-Izneid, T., Nadeem, M., Shariati, M. A., Khan, I. A., Imran, A., Orhan, I. E., Rizwan, M., Atif, M., Gondal, T. A., & Mubarak, M. S. (2019). Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review. *Biomed Pharmacother*, 112, 108612. doi:10.1016/j.biopha.2019.108612

Jaeschke, H., Ho, Y. S., Fisher, M. A., Lawson, J. A., & Farhood, A. (1999). Glutathione peroxidase-deficient mice are more susceptible to neutrophil-mediated hepatic parenchymal cell injury during endotoxemia: importance of an intracellular oxidant stress. *Hepatology*, 29(2), 443-450. doi:10.1002/hep.510290222

Jensen, C., & Teng, Y. (2020). Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7(33). doi:10.3389/fmolb.2020.00033

Kasper, H. U., Dries, V., Drebber, U., Kern, M. A., Dienes, H. P., & Schirmacher, P. (2005). Precision cut tissue slices of the liver as morphological tool for investigation of apoptosis. *In Vivo*, 19(2), 423-431. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15796207>

Khan, A. A., Chow, E. C., Porte, R. J., Pang, K. S., & Groothuis, G. M. (2009). Expression and regulation of the bile acid transporter, OSTalpha-OSTbeta in rat and human intestine and liver. *Biopharm Drug Dispos*, 30(5), 241-258. doi:10.1002/bdd.663

Khan, A. A., Chow, E. C., van Loenen-Weemaes, A. M., Porte, R. J., Pang, K. S., & Groothuis, G. M. (2009). Comparison of effects of VDR versus PXR, FXR and GR ligands on the regulation of CYP3A isozymes in rat and human intestine and liver. *Eur J Pharm Sci*, 37(2), 115-125. doi:10.1016/j.ejps.2009.01.006

Khan, A. A., Dragt, B. S., Porte, R. J., & Groothuis, G. M. (2010). Regulation of VDR expression in rat and human intestine and liver--consequences for CYP3A expression. *Toxicol In Vitro*, 24(3), 822-829. doi:10.1016/j.tiv.2009.12.011

Klassen, L. W., Thiele, G. M., Duryee, M. J., Schaffert, C. S., DeVeney, A. L., Hunter, C. D., Olinga, P., & Tuma, D. J. (2008). An in vitro method of alcoholic liver injury using precision-cut liver slices from rats. *Biochem Pharmacol*, 76(3), 426-436. doi:10.1016/j.bcp.2008.05.012

Kniepeiss, D., Houben, P., Stiegler, P., Berghold, A., Riedl, R., Kahn, J., & Schemmer, P. (2020). A prospective, randomized, single-blind, multicentre, phase III study on organ preservation with Custodiol-N solution compared with Custodiol(R) solution in



organ transplantation (kidney, liver and pancreas). *Trials*, 21(1), 62. doi:10.1186/s13063-019-3823-4

Knolle, P. A., & Gerken, G. (2000). Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev*, 174, 21-34. doi:10.1034/j.1600-0528.2002.017408.x

Knolle, P. A., & Limmer, A. (2003). Control of immune responses by scavenger liver endothelial cells. *Swiss Med Wkly*, 133(37-38), 501-506. doi:2003/37/smw-10261

Knolle, P. A., & Thimme, R. (2014). Hepatic immune regulation and its involvement in viral hepatitis infection. *Gastroenterology*, 146(5), 1193-1207. doi:10.1053/j.gastro.2013.12.036

Krebs, H. A. (1933). Untersuchungen über den Stoffwechsel der Aminosäuren im Tierkörper. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 217.

Kroemer, G., Galluzzi, L., & Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*, 87(1), 99-163. doi:10.1152/physrev.00013.2006

Krumdieck, C. L., dos Santos, J. E., & Ho, K. J. (1980). A new instrument for the rapid preparation of tissue slices. *Anal Biochem*, 104(1), 118-123. doi:10.1016/0003-2697(80)90284-5

L. Fisher, R., Judith, U., Paul, N., & Klaus, B. (2001). Histological and Biochemical Evaluation of Precision-cut Liver Slices. *Toxicology Methods*, 11(2), 59-79. doi:10.1080/105172301300128871

Lampl, S., Janas, M. K., Donakonda, S., Brugger, M., Lohr, K., Schneider, A., Manske, K., Sperl, L. E., Wettmarshausen, J., Muller, C., Laschinger, M., Hartmann, D., Huser, N., Perrochi, F., Schmitt-Kopplin, P., Hagn, F., Zender, L., Hornung, V., Borner, C., Pichlmair, A., Kashkar, H., Klingenspor, M., Prinz, M., Schreiner, S., Conrad, M., Jost, P. J., Zischka, H., Steiger, K., Kronke, M., Zehn, D., Protzer, U., Heikenwalder, M., Knolle, P. A., & Wohlleber, D. (2020). Reduced mitochondrial resilience enables non-canonical induction of apoptosis after TNF receptor signaling in virus-infected hepatocytes. *J Hepatol*. doi:10.1016/j.jhep.2020.06.026

Lanford, R. E., Feng, Z., Chavez, D., Guerra, B., Brasky, K. M., Zhou, Y., Yamane, D., Perelson, A. S., Walker, C. M., & Lemon, S. M. (2011). Acute hepatitis A virus infection is associated with a limited type I interferon response and persistence of intrahepatic viral RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(27), 11223-11228. doi:10.1073/pnas.1101939108

Langdale, L. A., Kajikawa, O., Frevert, C., & Liggitt, H. D. (2003). Sustained tolerance to lipopolysaccharide after liver ischemia-reperfusion injury. *Shock*, 19(6), 553-558. doi:10.1097/01.shk.0000055238.25446.64

Laschinger, M., Wang, Y., Holzmann, G., Wang, B., Stoss, C., Lu, M., Brugger, M., Schneider, A., Knolle, P., Wohlleber, D., Schulze, S., Steiger, K., Tsujikawa, K., Altmayr, F., Friess, H., Hartmann, D., Huser, N., & Holzmann, B. (2020). The CGRP receptor component RAMP1 links sensory innervation with YAP activity in the regenerating liver. *FASEB J*, 34(6), 8125-8138. doi:10.1096/fj.201903200R

- Lee, S. H., Culberson, C., Korneszczuk, K., & Clemens, M. G. (2008). Differential mechanisms of hepatic vascular dysregulation with mild vs. moderate ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 294(5), G1219-1226. doi:10.1152/ajpgi.00527.2007
- Leeman, W. R., van de Gevel, I. A., & Rutten, A. A. (1995). Cytotoxicity of retinoic acid, menadione and aflatoxin B(1) in rat liver slices using Netwell inserts as a new culture system. *Toxicol In Vitro*, 9(3), 291-298. doi:10.1016/0887-2333(95)00008-v
- Lerche-Langrand, C., & Toutain, H. J. (2000). Precision-cut liver slices: characteristics and use for in vitro pharmaco-toxicology. *Toxicology*, 153(1-3), 221-253. doi:10.1016/s0300-483x(00)00316-4
- Li, Z., & Cui, Z. (2014). Three-dimensional perfused cell culture. *Biotechnol Adv*, 32(2), 243-254. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.10.006
- Loguercio, C., & Federico, A. (2003). Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radic Biol Med*, 34(1), 1-10. doi:10.1016/s0891-5849(02)01167-x
- Lu, L., Finegold, M. J., & Johnson, R. L. (2018). Hippo pathway coactivators Yap and Taz are required to coordinate mammalian liver regeneration. *Exp Mol Med*, 50(1), e423. doi:10.1038/emm.2017.205
- Makrecka-Kuka, M., Krumschnabel, G., & Gnaiger, E. (2015). High-Resolution Respirometry for Simultaneous Measurement of Oxygen and Hydrogen Peroxide Fluxes in Permeabilized Cells, Tissue Homogenate and Isolated Mitochondria. *Biomolecules*, 5(3), 1319-1338. doi:10.3390/biom5031319
- Manske, K., Kallin, N., Konig, V., Schneider, A., Kurz, S., Bosch, M., Welz, M., Cheng, R. L., Bengsch, B., Steiger, K., Protzer, U., Thimme, R., Knolle, P. A., & Wohlleber, D. (2018). Outcome of Antiviral Immunity in the Liver Is Shaped by the Level of Antigen Expressed in Infected Hepatocytes. *Hepatology*, 68(6), 2089-2105. doi:10.1002/hep.30080
- Marchant, J. S., & Taylor, C. W. (1997). Cooperative activation of IP3 receptors by sequential binding of IP3 and Ca<sup>2+</sup> safeguards against spontaneous activity. *Curr Biol*, 7(7), 510-518. doi:10.1016/s0960-9822(06)00222-3
- Mass, E., Ballesteros, I., Farlik, M., Halbritter, F., Gunther, P., Crozet, L., Jacome-Galarza, C. E., Handler, K., Klughammer, J., Kobayashi, Y., Gomez-Perdiguero, E., Schultze, J. L., Beyer, M., Bock, C., & Geissmann, F. (2016). Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis. *Science*, 353(6304). doi:10.1126/science.aaf4238
- Melgert, B. N., Olinga, P., Jack, V. K., Molema, G., Meijer, D. K., & Poelstra, K. (2000). Dexamethasone coupled to albumin is selectively taken up by rat nonparenchymal liver cells and attenuates LPS-induced activation of hepatic cells. *J Hepatol*, 32(4), 603-611. doi:10.1016/s0168-8278(00)80222-6
- Messmann, H. (2020). *Klinische Gastroenterologie* (Vol. 2. Auflage): Helmut Messmann.

Mestas, J., & Hughes, C. C. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*, 172(5), 2731-2738. doi:10.4049/jimmunol.172.5.2731

Micheau, O., & Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, 114(2), 181-190. doi:10.1016/s0092-8674(03)00521-x

Miller, E., Yang, J., DeRan, M., Wu, C., Su, A. I., Bonamy, G. M., Liu, J., Peters, E. C., & Wu, X. (2012). Identification of serum-derived sphingosine-1-phosphate as a small molecule regulator of YAP. *Chem Biol*, 19(8), 955-962. doi:10.1016/j.chembiol.2012.07.005

Moreno, L., Perez-Vizcaino, F., Harrington, L., Faro, R., Sturton, G., Barnes, P. J., & Mitchell, J. A. (2006). Pharmacology of airways and vessels in lung slices in situ: role of endogenous dilator hormones. *Respir Res*, 7, 111. doi:10.1186/1465-9921-7-111

Ng, S. S., Xiong, A., Nguyen, K., Masek, M., No, D. Y., Elazar, M., Shteyer, E., Winters, M. A., Voedisch, A., Shaw, K., Rashid, S. T., Frank, C. W., Cho, N. J., & Glenn, J. S. (2017). Long-term culture of human liver tissue with advanced hepatic functions. *JCI Insight*, 2(11). doi:10.1172/jci.insight.90853

O'Connell, P. J., Morelli, A. E., Logar, A. J., & Thomson, A. W. (2000). Phenotypic and functional characterization of mouse hepatic CD8 alpha+ lymphoid-related dendritic cells. *J Immunol*, 165(2), 795-803. doi:10.4049/jimmunol.165.2.795

Okuda, M., Li, K., Beard, M. R., Showalter, L. A., Scholle, F., Lemon, S. M., & Weinman, S. A. (2002). Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology*, 122(2), 366-375. doi:10.1053/gast.2002.30983

Olinga, P., Groen, K., Hof, I. H., De Kanter, R., Koster, H. J., Leeman, W. R., Rutten, A. A., Van Twillert, K., & Groothuis, G. M. (1997). Comparison of five incubation systems for rat liver slices using functional and viability parameters. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 38(2), 59-69. doi:10.1016/s1056-8719(97)00060-9

Olinga, P., Hof, I. H., Merema, M. T., Smit, M., de Jager, M. H., Swart, P. J., Slooff, M. J., Meijer, D. K., & Groothuis, G. M. (2001). The applicability of rat and human liver slices to the study of mechanisms of hepatic drug uptake. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 45(1), 55-63. doi:10.1016/s1056-8719(01)00127-7

Olinga, P., Merema, M., Hof, I. H., de Jong, K. P., Slooff, M. J., Meijer, D. K., & Groothuis, G. M. (1998). Effect of human liver source on the functionality of isolated hepatocytes and liver slices. *Drug Metab Dispos*, 26(1), 5-11. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9443845>

Olinga, P., Merema, M. T., Hof, I. H., De Jager, M. H., De Jong, K. P., Slooff, M. J., Meijer, D. K., & Groothuis, G. M. (1998). Effect of cold and warm ischaemia on drug metabolism in isolated hepatocytes and slices from human and monkey liver. *Xenobiotica*, 28(4), 349-360. doi:10.1080/004982598239461

- Olinga, P., van der Hoeven, J. A., Merema, M. T., Freund, R. L., Ploeg, R. J., & Groothuis, G. M. (2005). The influence of brain death on liver function. *Liver Int*, 25(1), 109-116. doi:10.1111/j.1478-3231.2005.01035.x
- Olthof, P. B., Reiniers, M. J., Dirkes, M. C., Gulik, T. M. V., & Golen, R. F. V. (2016). Protective Mechanisms of Hypothermia in Liver Surgery and Transplantation. *Mol Med*, 21(1), 833-846. doi:10.2119/molmed.2015.00158
- Pai, K. S., & Ravindranath, V. (1991). Protection and potentiation of MPTP-induced toxicity by cytochrome P-450 inhibitors and inducer: in vitro studies with brain slices. *Brain Res*, 555(2), 239-244. doi:10.1016/0006-8993(91)90347-x
- Palma, E., Doornebal, E. J., & Chokshi, S. (2019). Precision-cut liver slices: a versatile tool to advance liver research. *Hepatol Int*, 13(1), 51-57. doi:10.1007/s12072-018-9913-7
- Parrish, A. R., Gandolfi, A. J., & Brendel, K. (1995). Precision-cut tissue slices: applications in pharmacology and toxicology. *Life Sci*, 57(21), 1887-1901. doi:10.1016/0024-3205(95)02176-j
- Parrish, A. R., Sallam, K., Nyman, D. W., Orozco, J., Cress, A. E., Dalkin, B. L., Nagle, R. B., & Gandolfi, A. J. (2002). Culturing precision-cut human prostate slices as an in vitro model of prostate pathobiology. *Cell Biol Toxicol*, 18(3), 205-219. doi:10.1023/a:1015567805460
- Picard, M., Taivassalo, T., Gouspillou, G., & Hepple, R. T. (2011). Mitochondria: isolation, structure and function. *J Physiol*, 589(Pt 18), 4413-4421. doi:10.1113/jphysiol.2011.212712
- Picard, M., Taivassalo, T., Ritchie, D., Wright, K. J., Thomas, M. M., Romestaing, C., & Hepple, R. T. (2011). Mitochondrial structure and function are disrupted by standard isolation methods. *PLoS One*, 6(3), e18317. doi:10.1371/journal.pone.0018317
- Pinter, M., Trauner, M., Peck-Radosavljevic, M., & Sieghart, W. (2016). Cancer and liver cirrhosis: implications on prognosis and management. *ESMO Open*, 1(2), e000042. doi:10.1136/esmoopen-2016-000042
- Plazar, J., Filipic, M., & Groothuis, G. M. (2008). Antigenotoxic effect of Xanthohumol in rat liver slices. *Toxicol In Vitro*, 22(2), 318-327. doi:10.1016/j.tiv.2007.09.009
- Plazar, J., Hreljac, I., Pirih, P., Filipic, M., & Groothuis, G. M. (2007). Detection of xenobiotic-induced DNA damage by the comet assay applied to human and rat precision-cut liver slices. *Toxicol In Vitro*, 21(6), 1134-1142. doi:10.1016/j.tiv.2007.02.012
- Polakos, N. K., Cornejo, J. C., Murray, D. A., Wright, K. O., Treanor, J. J., Crispe, I. N., Topham, D. J., & Pierce, R. H. (2006). Kupffer cell-dependent hepatitis occurs during influenza infection. *Am J Pathol*, 168(4), 1169-1178; quiz 1404-1165. doi:10.2353/ajpath.2006.050875
- Proost, J. H., Beljaars, L., Olinga, P., Swart, P. J., Kuipers, M. E., Reker-Smit, C., Groothuis, G. M., & Meijer, D. K. (2006). Prediction of the pharmacokinetics of

succinylated human serum albumin in man from in vivo disposition data in animals and in vitro liver slice incubations. *Eur J Pharm Sci*, 27(2-3), 123-132. doi:10.1016/j.ejps.2005.08.014

Protzer, U., Maini, M. K., & Knolle, P. A. (2012). Living in the liver: hepatic infections. *Nat Rev Immunol*, 12(3), 201-213. doi:10.1038/nri3169

Puche, J. E., Saiman, Y., & Friedman, S. L. (2013). Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Compr Physiol*, 3(4), 1473-1492. doi:10.1002/cphy.c120035

Racanelli, V., & Rehermann, B. (2006). The liver as an immunological organ. *Hepatology*, 43(2 Suppl 1), S54-62. doi:10.1002/hep.21060

Rasola, A., & Bernardi, P. (2011). Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium*, 50(3), 222-233. doi:10.1016/j.ceca.2011.04.007

Reese, T. A., Bi, K., Kambal, A., Filali-Mouhim, A., Beura, L. K., Burger, M. C., Pulendran, B., Sekaly, R. P., Jameson, S. C., Masopust, D., Haining, W. N., & Virgin, H. W. (2016). Sequential Infection with Common Pathogens Promotes Human-like Immune Gene Expression and Altered Vaccine Response. *Cell Host Microbe*, 19(5), 713-719. doi:10.1016/j.chom.2016.04.003

Rehermann, B., & Nascimbeni, M. (2005). Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol*, 5(3), 215-229. doi:10.1038/nri1573

Reinehr, R., Becker, S., Eberle, A., Grether-Beck, S., & Haussinger, D. (2005). Involvement of NADPH oxidase isoforms and Src family kinases in CD95-dependent hepatocyte apoptosis. *J Biol Chem*, 280(29), 27179-27194. doi:10.1074/jbc.M414361200

Rieske, J. S., Baum, H., Stoner, C. D., & Lipton, S. H. (1967). On the antimycin-sensitive cleavage of complex 3 of the mitochondrial respiratory chain. *J Biol Chem*, 242(21), 4854-4866. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6058931>

Riss, T., Niles, A., Moravec, R., Karassina, N., & Vidugiriene, J. (2004). Cytotoxicity Assays: In Vitro Methods to Measure Dead Cells. In G. S. Sittampalam, A. Grossman, K. Brimacombe, M. Arkin, D. Auld, C. P. Austin, J. Baell, B. Bejcek, J. M. M. Caaveiro, T. D. Y. Chung, N. P. Coussens, J. L. Dahlin, V. Devanaryan, T. L. Foley, M. Glicksman, M. D. Hall, J. V. Haas, S. R. J. Hoare, J. Inglese, P. W. Iversen, S. D. Kahl, S. C. Kales, S. Kirshner, M. Lal-Nag, Z. Li, J. McGee, O. McManus, T. Riss, P. Saradjian, O. J. Trask, Jr., J. R. Weidner, M. J. Wildey, M. Xia, & X. Xu (Eds.), *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD).

Russell W.M.S., B. R. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*: Methuen, UK.

Schmitt, S., Eberhagen, C., Weber, S., Aichler, M., & Zischka, H. (2015). Isolation of mitochondria from cultured cells and liver tissue biopsies for molecular and biochemical analyses. *Methods Mol Biol*, 1295, 87-97. doi:10.1007/978-1-4939-2550-6\_8

- Schmitt, S., Saathoff, F., Meissner, L., Schropp, E. M., Lichtmannegger, J., Schulz, S., Eberhagen, C., Borchard, S., Aichler, M., Adamski, J., Plesnila, N., Rothenfusser, S., Kroemer, G., & Zischka, H. (2013). A semi-automated method for isolating functionally intact mitochondria from cultured cells and tissue biopsies. *Anal Biochem*, *443*(1), 66-74. doi:10.1016/j.ab.2013.08.007
- Schumacher, K., Khong, Y. M., Chang, S., Ni, J., Sun, W., & Yu, H. (2007). Perfusion culture improves the maintenance of cultured liver tissue slices. *Tissue Eng*, *13*(1), 197-205. doi:10.1089/ten.2006.0046
- Schwabe, R. F., & Brenner, D. A. (2006). Mechanisms of Liver Injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *290*(4), G583-589. doi:10.1152/ajpgi.00422.2005
- Senior, A. E. (1988). ATP synthesis by oxidative phosphorylation. *Physiol Rev*, *68*(1), 177-231. doi:10.1152/physrev.1988.68.1.177
- Silbernagl, S., & Lang, F. (2010). *Color atlas of pathophysiology* (2nd ed.). Stuttgart ; New York: Thieme.
- Smedsrod, B. (2004). Clearance function of scavenger endothelial cells. *Comp Hepatol*, *3 Suppl 1*, S22. doi:10.1186/1476-5926-2-S1-S22
- Smith, P. F. e. a. (1986). Maintenance of adult rat liver slices in dynamic organ culture. *In Vitro Cell and Developmental Biology*, *22*.
- Staal, Y. C., Pushparajah, D. S., van Herwijnen, M. H., Gottschalk, R. W., Maas, L. M., Ioannides, C., van Schooten, F. J., & van Delft, J. H. (2008). Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons in binary mixtures: effects on gene expression and DNA adduct formation in precision-cut rat liver slices. *Mutagenesis*, *23*(6), 491-499. doi:10.1093/mutage/gen041
- Stadie, W. C., & Riggs, B. C. (1944). Microtome for the preparation of tissue slices for metabolic studies of surviving tissues in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, *154*.
- Starokozhko, V., Abza, G. B., Maessen, H. C., Merema, M. T., Kuper, F., & Groothuis, G. M. (2015). Viability, function and morphological integrity of precision-cut liver slices during prolonged incubation: Effects of culture medium. *Toxicol In Vitro*, *30*(1 Pt B), 288-299. doi:10.1016/j.tiv.2015.10.008
- Starokozhko, V., Vatakuti, S., Schievink, B., Merema, M. T., Asplund, A., Synnergren, J., Aspegren, A., & Groothuis, G. M. M. (2017). Maintenance of drug metabolism and transport functions in human precision-cut liver slices during prolonged incubation for 5 days. *Arch Toxicol*, *91*(5), 2079-2092. doi:10.1007/s00204-016-1865-x
- Sumpter, T. L., Abe, M., Tokita, D., & Thomson, A. W. (2007). Dendritic cells, the liver, and transplantation. *Hepatology*, *46*(6), 2021-2031. doi:10.1002/hep.21974
- Szalai, G., Krishnamurthy, R., & Hajnoczky, G. (1999). Apoptosis driven by IP(3)-linked mitochondrial calcium signals. *EMBO J*, *18*(22), 6349-6361. doi:10.1093/emboj/18.22.6349

- t Hart, N. A., van der Plaats, A., Faber, A., Leuvenink, H. G., Olinga, P., Wiersema-Buist, J., Verkerke, G. J., Rakhorst, G., & Ploeg, R. J. (2005). Oxygenation during hypothermic rat liver preservation: an in vitro slice study to demonstrate beneficial or toxic oxygenation effects. *Liver Transpl*, *11*(11), 1403-1411. doi:10.1002/lt.20510
- Takebe, T., Sekine, K., Enomura, M., Koike, H., Kimura, M., Ogaeri, T., Zhang, R. R., Ueno, Y., Zheng, Y. W., Koike, N., Aoyama, S., Adachi, Y., & Taniguchi, H. (2013). Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*, *499*(7459), 481-484. doi:10.1038/nature12271
- Tao, L., & Reese, T. A. (2017). Making Mouse Models That Reflect Human Immune Responses. *Trends Immunol*, *38*(3), 181-193. doi:10.1016/j.it.2016.12.007
- Toutain, H. J., Moronville-Halley, V., Sarsat, J. P., Chelin, C., Hoet, D., & Leroy, D. (1998). Morphological and functional integrity of precision-cut rat liver slices in rotating organ culture and multiwell plate culture: effects of oxygen tension. *Cell Biol Toxicol*, *14*(3), 175-190. doi:10.1023/a:1007458408863
- Umachandran, M., & Ioannides, C. (2006). Stability of cytochromes P450 and phase II conjugation systems in precision-cut rat lung slices cultured up to 72 h. *Toxicology*, *224*(1-2), 14-21. doi:10.1016/j.tox.2006.03.020
- van de Bovenkamp, M., Groothuis, G. M., Meijer, D. K., & Olinga, P. (2006). Precision-cut fibrotic rat liver slices as a new model to test the effects of anti-fibrotic drugs in vitro. *J Hepatol*, *45*(5), 696-703. doi:10.1016/j.jhep.2006.04.009
- van de Bovenkamp, M., Groothuis, G. M. M., Meijer, D. K. F., Slooff, M. J. H., & Olinga, P. (2006). Human liver slices as an in vitro model to study toxicity-induced hepatic stellate cell activation in a multicellular milieu. *Chem Biol Interact*, *162*(1), 62-69. doi:10.1016/j.cbi.2006.05.006
- van de Kerkhof, E. G., de Graaf, I. A., de Jager, M. H., & Groothuis, G. M. (2007). Induction of phase I and II drug metabolism in rat small intestine and colon in vitro. *Drug Metab Dispos*, *35*(6), 898-907. doi:10.1124/dmd.106.014563
- Vanhulle, V. P., Martiat, G. A., Verbeeck, R. K., Horsmans, Y., Calderon, P. B., Eeckhoudt, S. L., Taper, H. S., & Delzenne, N. (2001). Cryopreservation of rat precision-cut liver slices by ultrarapid freezing: influence on phase I and II metabolism and on cell viability upon incubation for 24 hours. *Life Sci*, *68*(21), 2391-2403. doi:10.1016/s0024-3205(01)01031-1
- Vickers, A. E., & Fisher, R. L. (2005). Precision-cut organ slices to investigate target organ injury. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, *1*(4), 687-699. doi:10.1517/17425255.1.4.687
- Vickers, A. E., Saulnier, M., Cruz, E., Merema, M. T., Rose, K., Bentley, P., & Olinga, P. (2004). Organ slice viability extended for pathway characterization: an in vitro model to investigate fibrosis. *Toxicol Sci*, *82*(2), 534-544. doi:10.1093/toxsci/kfh285
- Vittorelli, A., Gauthier, C., Michoudet, C., & Baverel, G. (2004). Metabolic viability and pharmaco-toxicological reactivity of cryopreserved human precision-cut renal cortical slices. *Toxicol In Vitro*, *18*(3), 285-292. doi:10.1016/j.tiv.2003.08.010

- Wajant, H., Pfizenmaier, K., & Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*, 10(1), 45-65. doi:10.1038/sj.cdd.4401189
- Wajant, H., & Scheurich, P. (2011). TNFR1-induced activation of the classical NF-kappaB pathway. *FEBS J*, 278(6), 862-876. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08015.x
- Wake, K. (1971). "Sternzellen" in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *Am J Anat*, 132(4), 429-462. doi:10.1002/aja.1001320404
- Walker, C. S., Conner, A. C., Poyner, D. R., & Hay, D. L. (2010). Regulation of signal transduction by calcitonin gene-related peptide receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 31(10), 476-483. doi:10.1016/j.tips.2010.06.006
- Wang, S., Rijk, J. C., Riethoff-Poortman, J. H., Van Kuijk, S., Peijnenburg, A. A., & Bovee, T. F. (2010). Bovine liver slices combined with an androgen transcriptional activation assay: an in-vitro model to study the metabolism and bioactivity of steroids. *Anal Bioanal Chem*, 397(2), 631-641. doi:10.1007/s00216-010-3605-z
- Wang, Y., Liu, S., Liu, H., Li, W., Lin, F., Jiang, L., Li, X., Xu, P., Zhang, L., Zhao, L., Cao, Y., Kang, J., Yang, J., Li, L., Liu, X., Li, Y., Nie, R., Mu, J., Lu, F., Zhao, S., Lu, J., & Zhao, J. (2020). SARS-CoV-2 infection of the liver directly contributes to hepatic impairment in patients with COVID-19. *J Hepatol*, 73(4), 807-816. doi:10.1016/j.jhep.2020.05.002
- Warburg, O. (1923). Versuche an überlebendem Karzinomgewebe. *Biochemische Zeitschrift*, 142.
- Westra, I. M., Mutsaers, H. A., Luangmonkong, T., Hadi, M., Oosterhuis, D., de Jong, K. P., Groothuis, G. M., & Olinga, P. (2016). Human precision-cut liver slices as a model to test antifibrotic drugs in the early onset of liver fibrosis. *Toxicol In Vitro*, 35, 77-85. doi:10.1016/j.tiv.2016.05.012
- Winau, F., Hegasy, G., Weiskirchen, R., Weber, S., Cassan, C., Sieling, P. A., Modlin, R. L., Liblau, R. S., Gressner, A. M., & Kaufmann, S. H. (2007). Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. *Immunity*, 26(1), 117-129. doi:10.1016/j.immuni.2006.11.011
- Wisse, E., De Zanger, R. B., Charels, K., Van Der Smissen, P., & McCuskey, R. S. (1985). The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. *Hepatology*, 5(4), 683-692. doi:10.1002/hep.1840050427
- Wohlleber, D., Kashkar, H., Gartner, K., Frings, M. K., Odenthal, M., Hegenbarth, S., Borner, C., Arnold, B., Hammerling, G., Nieswandt, B., van Rooijen, N., Limmer, A., Cederbrant, K., Heikenwalder, M., Pasparakis, M., Protzer, U., Dienes, H. P., Kurts, C., Kronke, M., & Knolle, P. A. (2012). TNF-induced target cell killing by CTL activated through cross-presentation. *Cell Rep*, 2(3), 478-487. doi:10.1016/j.celrep.2012.08.001
- Worboys, P. D., Bradbury, A., & Houston, J. B. (1997). Kinetics of drug metabolism in rat liver slices. III. Relationship between metabolic clearance and slice uptake rate. *Drug Metab Dispos*, 25(4), 460-467. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9107546>



- Wu, X., Roberto, J. B., Knupp, A., Kenerson, H. L., Truong, C. D., Yuen, S. Y., Brempelis, K. J., Tuefferd, M., Chen, A., Horton, H., Yeung, R. S., & Crispe, I. N. (2018). Precision-cut human liver slice cultures as an immunological platform. *J Immunol Methods*, *455*, 71-79. doi:10.1016/j.jim.2018.01.012
- Yang, Y. M., & Seki, E. (2015). TNFalpha in liver fibrosis. *Curr Pathobiol Rep*, *3*(4), 253-261. doi:10.1007/s40139-015-0093-z
- Yazdanpanah, B., Wiegmann, K., Tchikov, V., Krut, O., Pongratz, C., Schramm, M., Kleinridders, A., Wunderlich, T., Kashkar, H., Utermohlen, O., Bruning, J. C., Schutze, S., & Kronke, M. (2009). Riboflavin kinase couples TNF receptor 1 to NADPH oxidase. *Nature*, *460*(7259), 1159-1163. doi:10.1038/nature08206
- Yoon, J. H., & Gores, G. J. (2002). Death receptor-mediated apoptosis and the liver. *J Hepatol*, *37*(3), 400-410. doi:10.1016/s0168-8278(02)00209-x
- Yu, F. X., Zhang, Y., Park, H. W., Jewell, J. L., Chen, Q., Deng, Y., Pan, D., Taylor, S. S., Lai, Z. C., & Guan, K. L. (2013). Protein kinase A activates the Hippo pathway to modulate cell proliferation and differentiation. *Genes Dev*, *27*(11), 1223-1232. doi:10.1101/gad.219402.113
- Yu, F. X., Zhao, B., Panupinthu, N., Jewell, J. L., Lian, I., Wang, L. H., Zhao, J., Yuan, H., Tumaneng, K., Li, H., Fu, X. D., Mills, G. B., & Guan, K. L. (2012). Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell*, *150*(4), 780-791. doi:10.1016/j.cell.2012.06.037
- Yue, J., Wang, P., Liu, Y. H., Wu, J. Y., Chen, J., & Peng, R. X. (2007). Fast evaluation of oxidative DNA damage by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry coupled with precision-cut rat liver slices. *Biomed Environ Sci*, *20*(5), 386-391. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18188990>
- Zimmermann, M., Armeanu, S., Smirnow, I., Kupka, S., Wagner, S., Wehrmann, M., Rots, M. G., Groothuis, G. M., Weiss, T. S., Konigsrainer, A., Gregor, M., Bitzer, M., & Lauer, U. M. (2009). Human precision-cut liver tumor slices as a tumor patient-individual predictive test system for oncolytic measles vaccine viruses. *Int J Oncol*, *34*(5), 1247-1256. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19360338>
- Zimmermann, M., Lampe, J., Lange, S., Smirnow, I., Konigsrainer, A., Hann-von-Weyhern, C., Fend, F., Gregor, M., Bitzer, M., & Lauer, U. M. (2009). Improved reproducibility in preparing precision-cut liver tissue slices. *Cytotechnology*, *61*(3), 145-152. doi:10.1007/s10616-009-9246-4

## VII. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1: Graphische Zusammenfassung der Key Points</b> .....	3
<b>Abbildung 2: Klassische und nicht-kanonische CD8 T-Zell-Effektorfunktion</b> .....	9
<b>Abbildung 3: Caspasen-Aktivierung nach Bindung von TNF an den TNFR1</b> .....	11
<b>Abbildung 4: Schritte zur Herstellung muriner Precision-cut Liver Slices</b> .....	33
<b>Abbildung 5: Direkte Positionierung einer Schüttelplatte im Inkubator zur Vermeidung aufwendiger Installation von Inkubationssystemen</b> .....	34
<b>Abbildung 6: Herstellung humaner Precision-cut Liver Slices</b> .....	37
<b>Abbildung 7: Viabilität von Precision-cut Liver Slices</b> .....	43
<b>Abbildung 8: Virale Infektion <i>in vivo</i> und nach Herstellung von Precision-cut Liver Slices</b> .....	45
<b>Abbildung 9: TNF-induzierter Zelltod bei virusinfizierten Hepatozyten</b> .....	48
<b>Abbildung 10: Hintergrund-Signal von Caspase 3 Aktivität in nicht infizierten Precision-cut Liver Slices</b> .....	49
<b>Abbildung 11: Caspase 3 Aktivität nach Anwendung von Inhibitoren bei virusinfizierten PCLS</b> .....	52
<b>Abbildung 12: Metabolismus von Precision-cut Liver Slices</b> .....	55
<b>Abbildung 13: Viabilität humaner Precision-Cut Liver Slices</b> .....	58
<b>Abbildung 14: YAP-Expression und YAP-Phosphorylierung nach CGRP Behandlung in Precision-cut Liver Slices (Laschinger et al., 2020)</b> .....	61

## VIII. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus
ADP	Adenosindiphosphat
ALT	Alanin-Aminotransferase
APC	Antigen präsentierende Zelle (engl.: antigen presenting cell)
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
Caspase	engl.: cysteinyl aspartic acid protease
CsA	Cyclosporin A
CTL	zytotoxische T Zelle (engl.: cytotoxic T cell)
Cyt C	Cytochrom C
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere (lat.: et alii)
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung (9,81m/s <sup>2</sup> )
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HE	Hämatoxilin-Eosin
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
hPCLS	humane Precision-cut Liver Slices
HRP	engl. horseradish peroxidase
hTNF	humanes TNF
i.p.	intraperitoneal

## VIII. Abkürzungsverzeichnis

i.v.	intravenös
IFN	Interferon
IL	Interleukin
k	kilo
KO	knock out
l	Liter
LSEC	sinusoidalen Endothelzelle der Leber (engl.: liver sinusoidal endothelial cell)
M	Molar
m	milli-bzw. Meter
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: major histocompatibility complex)
min	Minute
mTNF	membrangebundenes TNF bzw. murines TNF
n	Gruppengröße bzw. nano-
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NFκB	engl.: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
Nr.	Nummer
ns	nicht signifikant
OCR	Sauerstoffverbrauchsrate (engl.: oxygen consumption rate)
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung
p. i.	nach Infektion (lat.: post infectionem)
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Struktur (engl.: pathogen associated molecular pattern)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
PCLS	Precision-cut Liver Slices
PFA	Paraformaldehyd
PFU	engl.: plaque forming unit
pH	lat.: potentia Hydrogenii
qRT-PCR	quantitativer reverse Transkriptase-PCR
RLU	engl. Relative light units

## VIII. Abkürzungsverzeichnis

RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl.: reactive oxygen species)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Standardabweichung (engl.: standard deviation)
SDS	engl. Sodium-dodecyl-sulfate
sTNF	lösliches TNF (engl.: soluble TNF)
SUIT	engl. Substrate-Uncoupler-Inhibitor-Titration
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween (engl.: Tris buffered saline with Tween)
TCR	T Zell-Rezeptor (engl.: T cell receptor)
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
U	Unit, internationale Einheit der Enzymaktivität
μ	mikro-

## IX. Vorveröffentlichungen

### Auszüge dieser Arbeit waren Bestandteil folgender Publikationen und Kongressbeiträge:

S Kurz, **M Brugger**, K Steiger, M Heikenwälder, PA Knolle, D Wohlleber  
*Interplay of caspase activation, calcium signaling and decreased mitochondria resilience enables viral clearance in the liver. Zeitschrift für Gastroenterologie 57 (01), P.5 22, 2019*

Melanie Laschinger, Yang Wang, Gabriela Holzmann, Baocai Wang, Christian Stöß, Miao Lu, **Marcus Brugger**, Annika Schneider, Percy Knolle, Dirk Wohlleber, Sarah Schulze, Katja Steiger, Kazutake Tsujikawa, Felicitas Altmayr, Helmut Friess, Daniel Hartmann, Norbert Hüser, Bernhard Holzmann. The CGRP receptor component RAMP1 links sensory innervation with YAP activity in the regenerating liver. *The FASEB Journal*. 2020;00:1–14.

Lampl S, Janas MK, Donakonda S, **Brugger M**, Lohr K, Schneider A, Manske K, Sperl LE, Wettmarshausen J, Müller C, Laschinger M, Hartmann D, Hüser N, Perrochi F, Schmitt-Kopplin P, Hagn F, Zender L, Hornung V, Borner C, Pichlmair A, Kashkar H, Klingenspor M, Prinz M, Schreiner S, Conrad M, Jost PJ, Zischka H, Steiger K, Krönke M, Zehn D, Protzer U, Heikenwälder M, Knolle PA, Wohlleber D. Reduced mitochondrial resilience enables non-canonical induction of apoptosis after TNF receptor signaling in virus-infected hepatocytes. *Journal of Hepatology* (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.06.026>.

**Marcus Brugger**, Melanie Laschinger, Sandra Lampl, Annika Schneider, Katrin Manske, Dena Esfandyari, Norbert Hüser, Daniel Hartmann, Katja Steiger, Stefan Engelhardt, Dirk Wohlleber, Percy A. Knolle. High precision-cut liver slice model to study cell-autonomous antiviral defense of hepatocytes within their microenvironment. *JHEP Reports* (2022), doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2022.100465>