

**Molekulare Mechanismen idiosynkratischer  
Medikamenten-vermittelter Leberschädigung**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Hanna Nievendick**

aus

Wesel

Bonn 2017

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter : Prof. Dr. med. Percy A. Knolle
2. Gutachter : Prof. Dr. med. Joachim L. Schultze

Tag der Promotion: 12.03.2018

Erscheinungsjahr: 2018

## **Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 6 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn vom 03. Juni 2011 im Zeitraum von Januar 2012 bis Mai 2017 von Herrn Prof. Dr. med. Percy A. Knolle betreut.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass

- die vorgelegte Arbeit – abgesehen von den ausdrücklich bezeichneten Hilfsmitteln – persönlich, selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde,
- die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht sind,
- die vorgelegte Arbeit oder ähnliche Arbeiten nicht bereits anderweitig als Dissertation eingereicht worden ist bzw. sind, sowie eine Erklärung über frühere Promotionsversuche und deren Resultate,
- für die inhaltlich-materielle Erstellung der vorgelegten Arbeit keine fremde Hilfe, insbesondere keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Person) in Anspruch genommen wurde sowie keinerlei Dritte vom Doktoranden unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Tätigkeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Arbeit stehen.

Bonn, den 17. Mai 2017

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>3</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>4</b>
1.1 Die Leber.....	4
1.1.1 Funktion der Leber.....	4
1.1.2 Mikroanatomie der Leber.....	5
1.1.3 LSEC.....	6
1.1.4 Hepatozyten.....	6
1.1.5 Effektorfunktionen Leber-assoziiierter Lymphozyten.....	7
1.1.6 Virale Infektionen der Leber.....	9
1.2 Apoptose.....	10
1.2.1 Caspasen.....	10
1.2.2 Aktivierung und Signaltransduktion der Apoptose.....	11
1.2.3 Der Tumor Nekrose Faktor.....	11
1.3 Medikamenten-induzierter Leberschaden.....	12
1.3.1 Pathogenese.....	13
1.3.2 Die Rolle von TNF bei der Entstehung von DILI.....	14
1.3.3 Die Rolle von Mitochondrien bei der Entstehung von DILI.....	15
1.3.4 Die Rolle von NK/NKT Zellen bei der Entstehung von DILI.....	15
1.3.5 Risikofaktoren.....	16
1.3.6 Maus-Modelle.....	16
1.4 Ximelagatran.....	19
1.4.1 Metabolismus.....	20
1.4.2 Wirkmechanismus.....	21
1.4.3 Pathomechanismus.....	21
<b>2 Fragestellung.....</b>	<b>23</b>
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>24</b>
3.1 Material .....	24
3.1.1 Geräte.....	24
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	25
3.1.3 Chemikalien und Reagenzien.....	26
3.1.4 Allgemeine Lösungen.....	28
3.1.5 Puffer.....	28
3.1.6 Kit Systeme.....	31
3.1.7 Antikörper.....	31
3.1.8 Western Blot Antikörper.....	31
3.1.9 Inhibitoren.....	32
3.1.10 Viren.....	32
3.1.11 Zelllinien.....	32
3.1.12 Mauslinien.....	32
3.2 Methoden.....	33

3.3 Western Blot.....	33
3.3.1 Probengewinnung.....	33
3.3.2 Proteinbestimmung.....	33
3.3.3 SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese).....	34
3.3.4 Blot.....	34
3.3.5 Antikörpermarkierung und Detektion.....	34
3.4 In vivo Experimente in Mäusen.....	35
3.4.1 Verabreichung von Medikamenten.....	35
3.4.2 Infektion von Mäusen mit Viren.....	36
3.4.3 Intraperitoneale Applikation von Substanzen.....	36
3.4.4 Intravenöse Applikation von TNF.....	36
3.4.5 Messung des Leberschadens.....	36
3.4.6 Überlebensversuche.....	37
3.4.7 Leberentnahme.....	37
3.4.8 Experimentelles Design der in vivo Versuche mit XIM.....	37
3.5 Leberhistologie.....	38
3.6 Caspase Assay.....	39
3.7 Bestimmung der Prothrombinzeit von Blut.....	39
3.8 Isolation von Mitochondrien aus der Mausleber.....	40
3.9 Ex vivo Behandlung von Mitochondrien mit XIM.....	41
3.10 Membranpotential und Anschwellen von Mitochondrien.....	41
3.11 In vivo Biolumineszenz nach AdGOL Infektion.....	44
3.12 Zellzahlbestimmung.....	44
3.13 Herstellung von Adenoviren.....	45
3.13.1 Ultrazentrifugation.....	45
3.13.2 Dialyse.....	45
3.13.3 Virustitration.....	46
3.14 Statistik.....	46
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
4.1 Etablierung eines in vivo Modells für iDILI.....	47
4.2 Keine Protektion vor XIM-DILI in rag-2/- Mäusen.....	50
4.3 Die Entwicklung von XIM-DILI ist abhängig von TNF-Rezeptor1/2 .....	52
4.4 Im LPS-Modell für iDILI induziert die alleinige Applikation von XIM keinen Leberschaden .....	54
4.5 XIM führt im Modell der TNF-induzierten viralen Hepatitis zu verstärktem Leberschaden und Mortalität der Mäuse.....	57
4.6 XIM-DILI ist unabhängig von der Thrombin-Inhibitoren durch XIM.....	62
4.7 Abhängigkeit von XIM-DILI von Viruslast und Expositionsdauer.....	66
4.7.1 Ausschließlich hohe Viruslast induziert XIM-vermittelten Leberschaden und Mortalität.....	66
4.7.2 Ausschließlich längere XIM-Adminstration induziert erhöhten Leberschaden und Mortalität.....	68
4.8 XIM verstärkt Apoptose von Leberzellen in Virus-infizierten Mäusen.....	69

4.8.1 Inhibition von XIM-DILI durch Blockade der Caspase-Aktivierung.....	73
4.9 Keine Induktion von ER-Stress durch Virusinfektion oder XIM.....	77
4.10 Einfluss von XIM auf die Sensitivität von Mitochondrien gegenüber dem Stressstimulus Calcium.....	79
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>84</b>
5.1 XIM ruft in Mäusen einen verstärkten viralen Leberschaden hervor und führt zur Mortalität.....	85
5.2 Verstärkter Leberschaden und Mortalität sind spezifisch für XIM.....	86
5.2.1 Einfluss auf die Gerinnung auf XIM-DILI.....	87
5.3 Der Mechanismus von XIM-DILI unterscheidet sich vom LPS-Modell für DILI.....	89
5.4 Der Einfluss von Leber-assoziierten Lymphocyten auf XIM-DILI.....	90
5.5 Rolle von TNF bei XIM-DILI.....	92
5.5.1 TNF-R1/2-/- Mäuse sind vor XIM-DILI geschützt.....	92
5.5.2 Der Einfluss von XIM auf das Modell der TNF-induzierten viralen Hepatitis...	93
5.6 XIM verstärkt die Apoptose in Leberzellen von Virus-infizierten Mäusen nach TNF-Stimulus.....	94
5.7 ER-Stress ist nicht in XIM-DILI involviert.....	95
5.8 Schädigung von Mitochondrien durch XIM in virusinfizierten Leberzellen.....	96
5.9 Schlussfolgerung.....	98
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>100</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>120</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>121</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>122</b>

## ZUSAMMENFASSUNG

Idiosyncratischer Medikamenten-induzierter Leberschaden (engl.: *idiosyncratic drug induced liver injury*, iDILI) stellt ein gravierendes Problem in der Medikamentenentwicklung und der klinischen Erforschung von Medikamenten dar. Die individuelle Suszeptibilität von Patienten ist multifaktoriell, wodurch diese Reaktionen nur schwer vorherzusagen sind. Aus klinischen Studien ist bekannt, dass Infektionen mit Viren und Bakterien einen wichtigen Risikofaktor bei der Entwicklung von DILI darstellen können. Zudem liefern Tiermodelle Hinweise darauf, dass Inflammation, beispielsweise durch das RNA Minetikum PolyI:C oder das Endotoxin LPS, die hepatotoxische Wirkung verschiedener DILI-assoziiierter Medikamente *in vivo* auslösen können.

Der Thrombininhibitor XIM wurde aufgrund von Leberschädigung in einer Subpopulation von Patienten vom pharmazeutischen Markt genommen. Allerdings konnte der zugrunde liegende Mechanismus bisher nicht aufgeklärt werden. In der vorgelegten Arbeit wird in Mäusen untersucht, ob gleichzeitige virale Infektionen einen Risikofaktor für die Entwicklung von XIM-induziertem Leberschaden (XIM-DILI) darstellt und wie dieser auf molekularer Ebene abläuft. Es wird erstmalig gezeigt, dass das Zusammenspiel von hepatischen Virusinfektion und die Exposition mit XIM zur Entwicklung eines massiven Leberschadens führt und in einer hohen Mortalität der Mäuse resultiert. Dabei ist die Induktion der Zellschädigung unabhängig vom verwendeten Virus und das pro-inflammatorische Zytokin TNF stellt den zentralen Mediator der hepatozellulären Schädigung dar. Mitochondrien, die zentralen Vermittler der Apoptose in Typ II Zellen, sind in Lebern koberhandelter Mäuse massiv geschädigt und verlieren nach Stimulation mit dem Stress-Stimulus Calcium ihr Membranpotential besonders schnell. Die daraus resultierende Aktivierung der ausführenden Caspasen ist nur in koberhandelten Tieren verstärkt und die Apoptoserate kann durch ATP-Depletion oder Caspase-Inhibition weitestgehend normalisiert werden. Dies ist das erste Tiermodell, das die Untersuchung von Hepatotoxizität, ausgelöst durch die Kombination einer Virusinfektion und eines DILI-assoziierten Medikaments, ermöglicht. Der Mechanismus hinter der hepatotoxischen Wirkung für

XIM kann somit erstmals *in vivo* auf molekularer Ebene untersucht werden. Dieses Modell zeigt, dass virale Infektion möglicherweise als Auslöser für DILI fungiert und dass das Zytokin TNF als zentraler Mediator der Hepatotoxizität agiert.

## ABSTRACT

Drug induced liver injury (DILI) represents a major problem in drug development, especially in the clinical development phase of drugs. The individual susceptibility of patients in depending on multiple factors, making it difficult to predict these adverse reactions. From clinical studies it is known that concurrent bacterial and viral infections represent an important risk factor in determining the susceptibility of a patient to develop DILI. Further more animal models provide evidence, that inflammation triggered by the RNA-mimetic PolyI:C or the endotoxin LPS can induce die hepatotoxic effect of several DILI-associated drugs *in vivo*.

The anticoagulant drug XIM was taken from the pharmaceutical marked because of liver liver-damaging effects in a subpopulation of patients. However the underlying mechanism could not been elucidated so far. In the presented work it is examined if concurrent viral infection represent a risk factor for the development of XIM-induced liver injury (XIM-DILI) in mice and how this is modulated on the molecular level. Is is shown for the first time that the interplay of hepatic viral infection combined with the exposition of XIM results in the development of massive liver damage leading to a high mortality rate of mice. In this process the induction of cell damage is independent of the used virus and the pro-inflammatory cytokin TNF functions as the central mediator of hepatocellular damage. Mitochondria, which represent the central mediator of apoptosis in type II cells, are massively damaged in livers of co-treated mice and these mitochondria lose their membrane potential faster after stimulation with the stress stimulus calcium. The resulting activation of the executing caspases is only enhanced in co-treated animals and the rate of apoptosis can be normalized by depletion of ATP or by inhibition of caspases. This is the first animal model which enables the investigation of hepatotoxicity triggered by a combination of virus inflection and a DILI-assoziated drug. The mechanism behind the hepatotoxic effect can thereby be studied *in vivo* on the molecular level for the first time. The model of XIM-DILI reveals that viral infections might serve as a trigger for drug-induced liver injury and that the cytokin TNF acts as the central mediator of hepatotoxicity.

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Die Leber

Die Leber verfügt über eine immense Komplexität, da sie aus einer Vielzahl verschiedenster Gewebe- und Immunzellpopulationen aufgebaut ist und eine einzigartige Vaskularität besitzt. Dadurch wird es der Leber ermöglicht lebenswichtige metabolische und immunologische Funktionen auszuüben, für die kein anderes Organ kompensieren kann. Auf diesem Grund stellen Schädigungen der Leber durch Autoimmunerkrankungen (Krawitt, 2006), bakterielle oder virale Infektionen (Lalazar and Ilan, 2014; Protzer et al., 2012) sowie Medikamente und Toxine (Kaplowitz, 2012) ein gravierendes gesundheitliches Problem dar.

### 1.1.1 Funktion der Leber

Funktionell übernimmt die Leber einerseits metabolische Aufgaben und andererseits ist sie – als lymphoides Organ – an der lokalen Regulation immunologischer Prozesse beteiligt (Crispe, 2009; Knolle and Gerken, 2000; Thomson and Knolle, 2010).

Im Bezug auf die Blutzirkulation hat die Leber eine besondere Stellung: Die Versorgung geschieht zu dreiviertel über die Pfortader (*Vena portae*) mit venösem, nährstoffreichem Blut aus dem Gastrointestinaltrakt und zu 25 % mit sauerstoffreichen Blut aus der systemischen Zirkulation über die hepatische Arterie (*Arteria hepatica propria*). In der Leber treffen beide Blutströme zusammen und führen zu einer arteriovenösen Blutversorgung der Lebersinusoide.

Durch das Blut gelangen Nährstoffe, Fremdantigene und Medikamente aus dem Darm in die Leber. Nährstoffe aus dem portalen venösen Blut werden extrahiert und dem hepatozellulären Metabolismus zugeführt. Zur gleichen Zeit werden toxische Abfallprodukte und pro-inflammatorische Agenzien wie Endotoxin oder andere bakterielle Degradationsprodukte aus dem Darm eliminiert ohne das eine Immunantwort diesen Antigenen gegenüber ausgelöst wird. In der Leber treffen die Antigene mit peripheren, im Blut zirkulierenden Leukozyten zusammen. Dabei wird die Vermeidung einer Immunantwort ge-

gen harmlose Nahrungsantigene und Medikamente durch das immunsuppressive Milieu der Leber gewährleistet, das eher Immuntoleranz als Immunität vermittelt (Crispe, 2003; Knolle and Limmer, 2001). Die immunologische Funktion der Leber wurde erstmals 1967 beschrieben als Transplantationsexperimente zeigen, dass auch ohne Verabreichung von Immunsuppressiva eine Abstoßungsreaktionen gegen Transplantate ausbleibt (Cantor and Dumont, 1967; Calne et al., 1969). Die Immunreaktionen in der Leber sind äußerst komplex, da neben der tolerogenen Reaktion auch Verteidigungsmechanismen gegen eindringende Pathogene wie Bakterien oder Viren ablaufen (Protzer et al., 2012).

### **1.1.2 Mikroanatomie der Leber**

Bei der Leber handelt es sich um das zentrale Stoffwechselorgan des Körpers. Durch die Vielzahl von sinusoidalen Verästelungen wird ein dreidimensionales Netzwerk von Gefäßen geschaffen. Die zahlreichen Verzweigungen und der geringe Durchmesser der Sinusoide (5-7  $\mu\text{m}$ ) führen zu einem stark verlangsamten Blutfluss (25-250  $\mu\text{m/s}$ ), der einen intensiven Stoffaustausch zwischen Blut und Leber ermöglicht (MacPhee et al., 1995). Zirkulierenden Leukozyten wird durch die geringe Fließgeschwindigkeit die Möglichkeit gegeben in engen Kontakt mit sinusoidalen Zellpopulationen und Hepatozyten zu treten.

Die hepatischen Sinusoide sind aus verschiedenen Zellpopulationen aufgebaut. Neben LSEC (engl.: *Liver sinusoidal endothelial cells*) sind Kupffer Zellen, Sternzellen, Leber-assoziierten Lymphozyten (engl.: *Liver-associated lymphocytes*, LAL) und Dendritische Zellen (DC) Bestandteil der Leberblutgefäße (Blouin et al., 1977).

Die Sinusoide werden von LSEC ausgekleidet wodurch eine Barriere zwischen parenchymalen Hepatozyten und zirkulierenden Lymphozyten ausgebildet wird (Limmer et al., 1998; Wisse et al., 1985). Durch kleine Poren zwischen den LSEC, sogenannte *Fenestrae*, wird ein Blutfluss in den Dissé-Raum ermöglicht und ein direkter Stoffaustausch zwischen Blut und Hepatozyten gewährleistet (Wisse, 1970; Wisse et al., 1985). Durch die *Fenestrae* im Leberendothel können Hepatozyten den Dissé-Raum überbrücken und auch direkt mit Lymphocyten interagieren (Bertolino et al., 1998; Warren et al., 2006).

### **1.1.3 LSEC**

LSEC sind Teil des retikulohistiozytären Zellsystems der Leber. Durch ihre außerordentliche Scavenger-Funktion sind sie in der Lage Antigene schnell via Rezeptor-vermittelter Endocytose aufzunehmen und zu eliminieren. Durch Transzytose wird ein Großteil der von LSEC aufgenommen Substanzen zu den Hepatozyten transportiert und von diesen metabolisiert (Tavassoli et al., 1986a, 1986b). Auch Viren wie das Hepatitis B Virus (HBV) oder das Hepatitis C Virus (HCV) nutzen diesen Transportmechanismus zur schnellen Infektion der Leberparenchymzellen (Protzer et al., 2012; Rehermann and Nascimbeni, 2005). Andersherum können auch virale Partikel von Hepatozyten durch Antigen-Kreuzpräsentation auf LSEC dargestellt werden und zur Aktivierung von CTL beitragen (Wohllber et al., 2012a).

### **1.1.4 Hepatozyten**

Der Hauptbestandteil des Lebergewebes sind die Leberparenchymzellen oder Hepatozyten. Mit 60 % sind diese Zellen die häufigsten der Leber und nehmen mit fast 80 % den Großteil des Lebervolumens ein (Blouin et al., 1977). Hepatozyten übernehmen zahlreiche metabolische Funktionen wie die Synthese von Proteinen, Fett- und Gallensäuren. Daneben sind die parenchymalen Zellen essentiell für die Detoxifikation, Modifikation und Exkretion von exogenen und endogenen Substanzen. So werden Medikamente, Toxine oder Antigene nach Modifikation bzw. Inaktivierung durch Hepatozyten entweder direkt in die Galle abgegeben oder ins Blut sezerniert, um im Anschluss über die Niere ausgeschieden zu werden. Durch ihre zentrale Rolle im Metabolismus, die hohe Prävalenz hepatotroper Viren und ihre Existenz innerhalb eines Milieus von Immunzellen sind Hepatozyten besonders anfällig gegenüber Schädigungen durch Medikamente oder Alkohol.

Die immunologische Funktion der Hepatozyten besteht vor allem in der Biosynthese von Komplement- und Akute-Phase-Proteinen, die wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems sind. Daneben können Hepatozyten trotz relativ geringer MHC I Expression Selbst-Antigene an naive CD8<sup>+</sup> T Zellen präsentieren (Bertolino et al., 2001).

### **1.1.5 Effektorfunktionen Leber-assoziiierter Lymphozyten**

Bei Leber-assoziierten Lymphozyten (LAL) handelt es sich um eine heterogene Zellpopulation aller sich in der Leber befindlichen Lymphozyten (Winnock et al., 1995). Bei der Elimination von Virus-infizierten Zellen spielen besonders CTL, NK und NKT Zellen eine entscheidenden Rolle.

#### *Zytotoxische CD8 T Zellen*

Zytotoxische CD8 T Zellen (engl.: *Cytotoxic T Lymphocyte*, CTL) verfügen über drei Effektorfunktionen mit dessen Hilfe sie Virus-infizierte Zellen eliminieren können: 1) Durch Perforin/Granzym-vermittelte Zytolyse, durch 2) Fas/FasL-vermittelte Aktivierung der Apoptose oder 3) durch Sekretion von Zytokinen. Dabei ist der direkte Zell-Kontakt bei der Perforin/Granzym-vermittelten Zytolyse und der Fas/FasL-vermittelten Aktivierung für die erfolgreiche Tötung der Zielzellen essentiell. Der dritte Effektormechanismus, die Freisetzung von Zytokinen, ist unabhängig von Zell-Zell Kontakt.

Die Perforin/Granzym-vermittelte Abtötung der Zielzellen wird ausschließlich bei direktem T Zell Rezeptor/MHC I-Kontakt aktiviert woraufhin die zytotoxischen Proteine Perforin, verschiedene Granzyme und Granulysin in die immunologische Synapse sekretiert werden. Perforin bildet Poren in der Membran der Zielzelle, durch die Granzyme und Granulysin eindringen und die Zelle abtöten. Die Initiierung des Zelltods geschieht über Caspase-abhängige und Caspase-unabhängige mitochondriale Signalwege (Bots and Medema, 2006). Der Einfluss von Perforin/Granzym bei der Eliminierung von virus-infizierten Hepatozyten wird kontrovers diskutiert. Während verschiedene Publikationen zeigen, dass die Clearance von Adenovirus aus der Leber in Perforin-defizienten Mäusen verlangsamt ist (Yang et al., 1995) und Hepatozyten resistent gegenüber Perforin-abhängigen CTL Effetormechanismen sind (Kafrouni et al., 2001), zeigen andere Publikationen, dass Perforin-defiziente Mäuse das Virus innerhalb eines Monates komplett entfernen (Elkon et al., 1997). Des Weiteren scheint in Hepatozyten das Schneiden von Bid durch Granzym B und die daraus resultierende mitochondriale Störung notwendig zu sein, um die für die Apoptose essentielle Caspase-Aktivierung zu erreichen (Riddle-Taylor et al., 2007; Sutton et al., 2000).

Der zweite Effektormechanismus von CTL läuft über direkte Interaktion von Fas-Ligand auf CTL und Fas-Rezeptor auf der Zielzelle ab. Dabei wird die klassische Caspase-Kaskade aktiviert und dadurch die Apoptose in der Zielzelle ausgelöst (Chirmule et al., 1999; Nagata and Golstein, 1995).

Eine weitere Möglichkeit virusinfizierte Zellen zu töten stellen von CTL sekretierte Zytokine wie IFN $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ) und TNF (Tumornekrosefaktor) dar (Braun et al., 1996). TNF interagiert mit dem TNF-Rezeptor (TNF-R) der Zielzelle und initiiert die Apoptose (siehe Kap. 1.2) (Andersen et al., 2006). Dabei wird die Apoptose selektiv in virusinfizierten Hepatozyten ausgelöst. (Wohlleber et al., 2012a). Für die Aktivierung von CTL ist die Präsentation von Antigenen nicht zwangsläufig auf Hepatozyten notwendig. Virale Antigene, die durch Kreuzpräsentation auf LSEC präsentiert werden, können CTL aktivieren und zur Freisetzung von TNF führen (Wohlleber et al., 2012a). Die Bedeutung von TNF und IFN $\gamma$  zeigt sich auch darin, dass die Elimination von nichtcytopathischen replikationsdefizienten Adenoviren aus der Leber in TNF (Elkon et al., 1997) oder IFN $\gamma$  (Yang et al., 1995) defizienten Mäusen stärker als in Perforin defizienten Mäusen reduziert ist.

### *NK Zellen und NKT Zellen*

NK (engl.: *natural killer*) und NKT (engl.: *natural killer T*) Zellen übernehmen Schlüsselfunktionen bei der antiviralen und antitumoralen Immunabwehr. In der Anzahl von hepatischen NK und NKT Zellen unterscheiden sich Mensch und Maus allerdings deutlich. Während der Anteil von NK Zellen an Lymphozyten in der menschlichen Leber bei 20-30 % liegt – ein verglichen mit 5 % im peripheren Blut verhältnismäßig hoher Anteil – beträgt er in der Maus 5-10 % (Doherty et al., 1999; (Gao et al., 2009). NKT Zellen haben einen Anteil von 20-35 % an der murinen und von 10-15 % an der humanen LAL-Population (Gao et al., 2009).

Hepatische NK und NKT Zellen übernehmen nach ihrer Aktivierung viele ähnliche Funktionen wie z.B. die Produktion von großen Mengen pro-inflammatorischer Zytokine und das Abtöten Virus-infizierter Zellen. Virale Infektionen von Mäusen mit LCVM (Lymphozytäres Choriomeningitis Virus) oder Adenovirus, sowie die Behandlung mit dem RNA-Mimetikum PolyI:C führen zur Akkumulation und Aktivierung von NK Zellen in der Leber (Dong et al., 2004; McIntyre and Welsh, 1986). Verschiedene Adhäsionsmoleküle werden

auf der Oberfläche exprimiert und pro-inflammatorische Zytokine wie TNF und IFN $\gamma$  sekretiert (Gao et al., 2009). Aktivierte NK Zellen töten Hepatozyten über TRAIL (engl.: *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) und/oder Perforin/Granzym B (Ochi et al., 2004). Die wichtigsten Effektormechanismen NKT Zell-vermittelter Leberschädigung sind die Produktion großer Mengen verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine wie IFN $\gamma$  und TNF, sowie das Töten von Hepatozyten über FasL (Biburger and Tiegs, 2005; Minagawa et al., 2004; Takeda et al., 2000).

### **1.1.6 Virale Infektionen der Leber**

Die Leber kann von einer Vielzahl von Viren infiziert werden. Dazu zählen hauptsächlich die hepatotropen Viren HAV (Hepatitis A Virus), HBV (Hepatitis B Virus), HCV (Hepatitis C Virus) und HEV (Hepatitis E Virus), die in der Leber replizieren und für die die Leber das Hauptziel darstellt (Rehermann and Nascimbeni, 2005). Neben den klassischen hepatotropen Viren kann die Leber auch als Teil einer generellen Wirtsinfektion mit Viren, die primär andere Organe infizieren, befallen werden. Beispiele für dieses Phänomen sind Epstein-Barr Virus, Cytomegalovirus, Herpes Simplex Virus (HSV), Varizella Zoster Virus, Humaner Herpes Virus 6, 7 und 8, humanes Parvovirus B19 sowie Adenovirus (Gallegos-Orozco and Rakela-Brödner, 2010). Chronische Schädigungen treten bei Infektionen durch HCV und HBV auf, während Infektionen mit den anderen Viren eine akute Hepatitis der Leber hervorrufen (Everhart and Ruhl, 2009). Die Schäden von nicht-hepatotropen Virusinfektion reichen von leichten Störungen der Leberbiochemie bis hin zu fulminantem Leberversagen.

Die Verbreitung viraler Leberinfektionen variiert je nach Virus und geographischer Region sehr stark. In den USA liegt beispielsweise die Prävalenz von HBV bei nur 0,4 % während sie bei HEV 21 % beträgt (Kim, 2009; Kuniholm et al., 2009). Trotz der insgesamt relativen Häufigkeit hepatotroper Infektionen laufen diese zumeist unbemerkt ab.

## 1.2 Apoptose

Der Prozess der Apoptose wurde erstmals 1972 von Kerr *et al.* als besondere Form des Zelltods beschrieben (Kerr et al., 1972). Dabei basiert die Klassifikation primär auf morphologischen Kriterien wie Chromatinkondensation (Pyknose), Schrumpfen des Zytoplasmas und Fragmentierung des Zellkerns (Karyorrhexis). Ein weiteres Merkmal ist der Prozess des Membran-Blebbing: die Aufteilung der Zelle in definierte Kompartimente, die als apoptotische Körper bezeichnet werden. Diese enthalten nukleare Fragmente und tragen Signalmoleküle wie Phosphatidylserin auf der Oberfläche, die als „eat me“ Signale die Aufnahme durch phagozytierende Zellen vermitteln (Ravichandran, 2010; Taylor et al., 2008). In der Leber übernehmen Sternzellen und Kupffer Zellen als residente Makrophagen diese Aufgabe (Canbay et al., 2003a, 2003b; Jiang et al., 2009). Bei der Apoptose wird durch die rasche Phagozytose apoptotischer Körper die Freisetzung von Zellbestandteilen in das umliegende Gewebe verhindert. Dadurch kommt es, im Gegensatz zur Nekrose, bei der Zellen anschwellen und platzen, nicht zu einer unerwünschten Immunantwort (Raff, 1998).

### 1.2.1 Caspasen

Für die Ausführung der Apoptose ist die Aktivierung von Caspasen essentiell. Bei Caspasen handelt es sich um Cystein-abhängige Aspartat-spezifische Proteasen, die als Zymogene synthetisiert werden und ihre Aktivität erst durch proteolytische Spaltung am Aspartatende erlangen (Nicholson and Thornberry, 1997). Sie werden in Initiator-Caspasen und Effektor-Caspasen unterteilt. Da die Initiator-Caspasen 2, 8, 9 und 10 die ausführenden Caspasen durch proteolytische Spaltung in ihre aktive Form überführen kommt es zu einer exponentiellen Verstärkung des Apoptosesignals (Raff, 1998). Die Initiator-Caspasen 8 und 10 sind in die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose involviert, während Caspase 9 den Zelltod nach mitochondrialer Schädigung initiiert (Eeva et al., 2009; McDonnell et al., 2003). Da die Aktivierung von Caspasen zentral für Ausführung der Apoptose ist, kann durch ihre Inhibition die Apoptose verlangsamt oder sogar vollständig gehemmt werden (Canbay et al., 2004; Earnshaw et al., 1999).

### **1.2.2 Aktivierung und Signaltransduktion der Apoptose**

Die Aktivierung der Apoptose kann über den extrinsischen oder den intrinsischen Weg ablaufen. Beim extrinsischen Weg läuft die Aktivierung der Caspase-Kaskade über Todesrezeptoren, während bei der intrinsisch aktivierten Apoptose der Zelltod über intrazelluläre Signale eingeleitet wird.

In der Leber sind bei der extrinsisch induzierten Apoptose die Todesrezeptoren der TNF-Superfamilie Fas, TNF-R1, TRAIL-R1/2 die wichtigsten Initiatoren der apoptotischen Signaltransduktion (MALHI et al., 2010). Nach Stimulation mit ihrem kognaten Liganden FasL, TNF beziehungsweise TRAIL oligomerisieren die Rezeptoren und rekrutieren verschiedene Adaptorproteine, die zur Spaltung der Initiator-Caspase 8 führen.

Die Aktivierung von Caspase 8 führt, je nach Zelltyp, in verschiedene Signaltransduktionswege. In Typ I Zellen kann aktive Caspase 8 direkt die Effektor-Caspasen 3/6 und 7 aktivieren. Bei Hepatozyten handelt es sich um Typ II Zellen ((Özören and El-Deiry, 2002). Bei diesem Zelltyp sind Mitochondrien zentrales Element der Apoptose. In Typ II Zellen wird nach Rezeptorstimulation weniger aktive Caspase 8 als in Typ I Zellen gebildet (Scaffidi et al., 1998). Daher ist eine Amplifikation des apoptotischen Signals notwendig. Diese wird durch die Spaltung des Proteins Bid in t-Bid (engl.: *truncated Bid*) durch Caspase 8 vermittelt. tBid transloziert zu den Mitochondrien und permeabilisiert in Zusammenarbeit mit aktivem Bax und Bak die äußere Mitochondrienmembran wodurch es zur Freisetzung pro-apoptotischer Moleküle wie Cytochrom c kommt (Korsmeyer et al., 2000; Kuwana et al., 2002). Freigesetztes Cytochrom c bildet zusammen mit APAF-1 (engl.: *apoptotic protease activating factor 1*) und Caspase 9 das Apoptosom, wodurch die autokatalytische Aktivierung von Procaspase 9 ermöglicht wird (Li et al., 1997; Zou et al., 1999). Anschließend wird Procaspase 3 zum Apoptosom rekrutiert, durch Proteolyse von aktivierter Caspase 9 gespalten und somit aktiviert. Die Effektor-Caspase 3 vermittelt den Tod der Zelle durch Apoptose (Porter and Jänicke, 1999; Zimmermann et al., 2001).

### **1.2.3 Der Tumor Nekrose Faktor**

Der Tumornekrosefaktor (TNF) wurde erstmals vor über vier Jahrzehnten als von Makrophagen exprimiertes Zytokin beschrieben, dass zur Lyse von Tumorzellen durch Nekrose führen kann (Carswell et al., 1975). Das Molekül ist Bestandteil der TNF Liganden Super-

familie und wirkt neben der Induktion von Apoptose auch als pro-inflammatorisches Zytokin auf Immunreaktionen ein. Abhängig von Zelltyp, Dauer und Stärke des Signals sowie der Umgebung hat TNF als pleiotropes Zytokin eine Vielzahl unterschiedlicher und teils sehr gegensätzlicher Wirkungen (Aggarwal, 2003; Locksley et al., 2001). Auch auf Parenchymzellen der Leber hat TNF vielfältige Auswirkungen. Zum Einen induziert es in durch Virusinfektion sensitivierten Hepatozyten die Apoptose (Wohlleber et al., 2012a), zum Anderen ist es für die Proliferation während der Leberregeneration essentiell (Akerman et al., 1992; Diehl et al., 1994). Makrophagen, wie beispielsweise die Kupffer Zellen der Leber, stellen die Hauptproduzenten von TNF dar. Daneben wird das Molekül jedoch auch von Monocyten, T und B Zellen, NK Zellen, Mastzellen sowie Neutrophilen und Eosinophilen Granulozyten als Reaktion auf Infektionen, Entzündungen und Verletzungen produziert (Baud and Karin, 2001).

Es existieren zwei Formen von TNF: die membrangebundene (mTNF) und die lösliche Form (sTNF), wobei das sTNF durch proteolytische Spaltung von mTNF generiert wird (Grell, 1995). Durch Bindung von der Liganden mTNF oder sTNF an den TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1) oder TNF-R 2 kann es wie oben beschrieben zur Aktivierung von Caspasen und dadurch zur Induktion von Apoptose kommen (siehe Kap. 1.2.2). Neben der Apoptoseinduktion können über die Bindung von TNF an seine Rezeptoren eine Vielzahl von Signalen vermittelt werden. Dazu gehört beispielsweise die Aktivierung von NfκB, die Induktion von Adhäsions- und Zytokin-Genen sowie des Zellwachstums (Parameswaran and Patial, 2010). Während TNF-R1 auf allen bisher untersuchten Zelltypen exprimiert wird, findet sich TNF-R2 vornehmlich auf Immun- und Endothelzellen (Aggarwal, 2003).

### **1.3 Medikamenten-induzierter Leberschaden**

Die Leber ist das zentrale Organ für den Metabolismus und die Eliminierung körperfremder Substanzen. Daher ist sie auch besonders anfällig gegenüber Schädigungen durch Medikamente oder Toxine (Björnsson et al., 2013). Bisher wurden etwa 1000 Medikamente mit Medikamenten-induziertem Leberschaden (engl.: *drug-induced liver injury*, DILI) in Verbindung gebracht (Zimmerman, 1999) und DILI stellt die häufigste Ursache dar, um zugelassene Medikamente vom pharmazeutischen Markt zu nehmen oder deren

klinische Entwicklung zu beenden (Temple and Himmel, 2002). DILI ist für etwa die Hälfte aller Fälle von akutem Leberversagen in Europa und den USA verantwortlich (Hadem et al., 2012; Reuben et al., 2010) und kann alle phänotypischen Formen von akuten und chronischen Lebererkrankungen aufweisen (Kaplowitz, 2012). Daher ist die Häufigkeit von toxischen Medikamentenreaktionen in der klinischen Praxis wahrscheinlich häufig unterschätzt (Sgro et al., 2002). Berechnungen gehen bei 10 % aller Fälle von Gelbsucht und bei 1 % aller stationär aufgenommenen Patienten von hepatotoxischen Reaktionen gegen Medikamente aus (Meier et al., 2005). Je nach Studie und untersuchtem Medikament variiert die Inzidenz von DILI stark und reicht von 1 in 10000 bis 1 in 10000 Patienten (Andrade et al., 2005; Chalasani et al., 2008). Aufgrund der geringen Inzidenz von DILI werden die hepatotoxischen Eigenschaften von Medikamenten häufig erst spät in klinischen Studien oder erst nach Marktzulassung offensichtlich.

### **1.3.1 Pathogenese**

Generell wird DILI in Dosis-abhängigen und damit vorhersagbaren Leberschaden und nicht vorhersagbaren, den sogenannten idiosynkratischen Leberschaden klassifiziert (Kaplowitz, 2004). Medikamente, die zu vorhersagbarem Leberschaden führen tun dies normalerweise innerhalb von wenigen Tagen und das als Resultat direkter Toxizität des Ausgangswirkstoffes oder eines reaktiven Metaboliten (James et al., 2003a). Durch die vorhersagbaren Reaktionen dieser sogenannten intrinsischen Hepatotoxizität ist der Leberschaden in Tiermodellen häufig reproduzierbar. Paracetamol ist der wohl bekannteste und am besten untersuchte Vertreter dieser Klasse von Medikamenten (Jaeschke et al., 2014; James et al., 2003a). Allerdings ist die überwiegende Mehrzahl hepatotoxischer Medikamente mit idiosynkratischen Reaktionen assoziiert. Idiosynkratischer Medikamenten-induzierter Leberschaden (engl.: *idiosyncratic drug-induced liver injury*, iDILI) tritt nach einer variablen Latenz (eine Woche bis ein Jahr) als Störung der Lebertransaminasen, besonders der Alanin-Aminotransferase (ALT) in Erscheinung und ist meist nicht dosisabhängig (Kaplowitz, 2001). Durch die geringe Inzidenz von iDILI gekoppelt mit dem Fehlen von verlässlichen Biomarkern und robusten präklinischen Testsystemen sind die Mechanismen, die zur Entstehung von iDILI führen bisher weitgehend unbekannt (Tujios and Fontana, 2011). Dabei liegt der Schlüssel um iDILI verlässlich verhindern und vorher-

sagen zu können im Verständnis der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen (Holt and Ju, 2006). Bekannt ist, dass bei der Pathogenese von DILI eine toxische Verbindung – das Medikament selbst oder ein Metabolit dessen – entweder eine Immunantwort hervorruft oder direkt auf die Biochemie der Zelle einwirkt. Beide Fälle führen zum Tod der Zelle durch Nekrose oder Apoptose und resultieren beim massenhaften Sterben von Zellen in der Ausbildung einer Hepatitis (Kaplowitz, 2002). Reaktive Metabolite können oxidativen Stress und damit verbunden Depletion von reduziertem Glutathion (GSH) hervorrufen (Mitchell et al., 1973) oder kovalente Bindungen zu Proteinen, Lipiden sowie Nukleinsäuren eingehen. Dadurch kann es zu einer massiven Schädigung von Zellorganellen wie Mitochondrien oder ER (endoplasmatisches Retikulum), intrazellulärem Stress, Sensitivierung gegenüber TNF oder nach Hapten-Bildung zu Immunreaktionen kommen. Weiterhin können toxische Metabolite durch Aktivierung oder Inhibition von Signalkinasen, Transkriptionsfaktoren oder der Genexpression auf Organellen einwirken. Der daraus resultierende zelluläre Stress kann zum Zelltod durch Apoptose oder Nekrose führen (Kaplowitz, 2004).

Hepatozyten sind durch ihre zentrale Rolle im Metabolismus, die hohe Prävalenz hepatotroper Viren und ihre Existenz innerhalb eines Milieus von Immunzellen besonders anfällig gegenüber Schädigungen durch Xenobiotika wie Medikamente oder Alkohol. Aber auch LSEC oder das Epithelium des Gallenganges können durch Medikamente geschädigt werden (DeLeve et al., 1996; Odin et al., 2001).

### **1.3.2 Die Rolle von TNF bei der Entstehung von DILI**

Bei verschiedenen Formen des Medikamenten-induzierten Leberschadens spielt das Zytokin TNF eine entscheidende Rolle. Medikamente oder ihre Metaboliten können entweder zu einer verstärkten Produktion von TNF führen oder Hepatozyten gegenüber den pro-apoptischen Effekten von TNF sensitivieren. So verhindert beispielsweise die Neutralisierung von TNF oder die Verwendung von TNF-R1 Knock-out Mäusen die Tetrachlormethan-vermittelte Hepatotoxizität (Czaja et al., 1995; Morio et al., 2001). Im Fall von Paracetamol führt die verstärkte Produktion von TNF durch Knock-out des TNF-herabregulierenden C-C Chemokin-Rezeptor 2 (CCR2) zur verstärkten Hepatotoxizität des Medikaments und kann durch Neutralisation von TNF inhibiert werden (Hogaboam et al.,

2000). Auch bei der durch PolyI:C verstärkten Halothan-induzierten Leberschädigung spielt TNF eine wichtige Rolle. Die Behandlung mit PolyI:C aktiviert Kupffer und NK Zellen, die neben anderen pro-apoptotischen Faktoren wie NKG2G und FasL auch TNF hochregulieren. Durch Depletion von TNF kann die Leberschädigung signifikant reduziert werden (Cheng et al., 2009a).

### **1.3.3 Die Rolle von Mitochondrien bei der Entstehung von DILI**

Medikamente oder ihre reaktiven Metabolite können auf die Atmungskette von Mitochondrien einwirken und eine Reihe von schädlichen Reaktionen verursachen. Dazu zählen ATP-Depletion, Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (engl.: *reactive oxygen species*, ROS), Inhibition der  $\beta$ -Oxidation, mitochondriale DNA-Schädigung und Erhöhung der mitochondrialen Membranpermeabilität (Lucena et al., 2010a; Wang, 2014).

Auch die Analyse genetischer Risikofaktoren belegt die Rolle von Mitochondrien bei der Entwicklung von DILI. Verschiedene Studien zeigen eine Verbindung zwischen Polymorphismen mitochondrialer Gene und DILI. So wurde Valproinsäure-induzierte Toxizität mit Varianten im mitochondrialen DNA Polymerase  $\gamma$  Gen (POLG1) assoziiert. (Stewart et al., 2010). Des Weiteren findet sich eine Verbindung zwischen Polymorphismen im Superoxid-Dismutase (SOD) 2 Gen und der Hepatotoxizität verschiedener Medikamente. Das Protein SOD 2 ist für das Abfangen von mitochondrialem Superoxid, einem toxischen Nebenprodukt der mitochondrialen Elektronentransportkette verantwortlich. Heterozygote SOD 2 Knockout Mäuse zeigen nach Behandlung mit Paracetamol oder Troglitazon eine verstärkte Schädigung der Leber, was den toxischen Einfluss von ROS auf Mitochondrien der Hepatozyten verdeutlicht (Fujimoto et al., 2009; Lucena et al., 2010b; Ong et al., 2007; Ramachandran et al., 2011a).

### **1.3.4 Die Rolle von NK/NKT Zellen bei der Entstehung von DILI**

Auch die Aktivierung des innate Immunsystems kann zur Entwicklung von DILI beitragen. So wurde gezeigt, dass NK/NKT Zellen, die mit 20-50 % einen wesentlichen Anteil der hepatischen Leukozyten-Population ausmachen (Doherty and O'Farrelly, 2000; Hashimoto et al., 1995; Liu et al., 2000; Wiltrout, 2000), eine entscheidende Rolle bei der Paracetamol-induzierten Hepatotoxizität spielen. Die Depletion von NK/NKT Zellen schützt Mäuse signifikant vor Toxizität durch Paracetamol, wie die Messung verschiedener Para-

meter zeigt. So wird das ALT-Level und Nekrose reduziert, das Überleben der Mäuse verbessert, die IFN $\gamma$ -Expression inhibiert, sowie die Akkumulation von Neutrophilen in der Leber reduziert (Liu et al., 2004). Bei der Halothane-induzierten Leberschädigung führt die Kobehandlung von Mäusen mit PolyI:C, einem viralen RNA-Mimetikum, zu einem verstärkten Leberschaden, welcher durch Depletion von NK Zellen signifikant reduziert werden kann (Cheng et al., 2009).

### **1.3.5 Risikofaktoren**

Das Risiko zur Entwicklung von Hepatotoxizität wird durch ein komplexes Zusammenspiel der chemischen Eigenschaften eines Medikaments, Umweltfaktoren (z.B. gleichzeitige Einnahme anderer Medikamente oder Alkohol), Alter, Geschlecht, genetischer Faktoren und anderen zugrunde liegenden Erkrankungen gesteuert (Kaplowitz, 2004).

Genetische Faktoren betreffen Gene, die das Verarbeiten von Medikamenten (Metabolismus, Detoxifikation und Transport) steuern, sowie Gene, die Schädigung und Reparatur der Zelle beeinflussen (Kaplowitz, 2012). Ein sehr gut dokumentierter Risikofaktor für DILI ist Medikamenteneinnahme gekoppelt mit zugrunde liegenden bakteriellen oder viralen Infektionen. So wird die Wahrscheinlichkeit eine Medikamenten-induzierte Leberschädigung zu entwickeln durch HIV (Humanes Immundefizienz-Virus), HBV, HCV oder HBV/HCV Koinfektion signifikant erhöht (Bonacini, 2004; den Brinker et al., 2000; Kim et al., 2016; Ungo et al., 1998; Wong et al., 2000; Wu et al., 1990). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass inflammatorischer Stress durch virale Infektionen während Arzneimiteleinnahme möglicherweise zur Entstehung von hepatotoxischen Reaktionen gegen Medikamente beiträgt.

### **1.3.6 Maus-Modelle**

Durch die geringe Inzidenz, den zumeist idiosynkratischen Charakter und die Abhängigkeit von individuellen Risikofaktoren lassen sich Medikamenten-induzierte Leberschäden auch im Tiermodell nur schwer nachstellen. Denn auch im Tier sind die Reaktionen, wie im Menschen, idiosynkratisch und damit nicht vorhersagbar und sehr selten. Daher existieren nur wenige Maus-Modelle, die es ermöglichen könnten hepatotoxische Medikamente bereits in der präklinischen Forschung zu eliminieren oder gar die Mechanismen hinter iDILI aufzuklären.

### *Paracetamol*

Die Mechanismen der Paracetamol-Toxizität sind verhältnismäßig gut untersucht, da es eines der wenigen Medikamente ist, dass dosisabhängig und verlässlich einen Leberschaden hervorruft (Jaeschke et al., 2014). Das Maus-Modell für Paracetamol-Hepatoxizität wurde bereits in den 1970er Jahren etabliert (Mitchell et al., 1973). Bei Überdosierung wird Paracetamol in Hepatozyten durch die Cytochrom P450 Enzyme Cyp2E1 und Cyp2A2 zu *N*-Acetyl-*p*-benzochinonimin (NAPQI) metabolisiert (Raucy et al., 1989; Zaher et al., 1998). Das reaktive Metabolit NAPQI kann teilweise durch GSH detoxifiziert werden, was in der Depletion der natürlichen Antioxidanz resultiert. Da im Falle einer Überdosierung nicht ausreichend GSH zur Entgiftung zur Verfügung steht reagiert überschüssiges NAPQI mit Sulfhydryl-Gruppen von Cytein, wodurch es zur Bindung an zelluläre und mitochondriale Proteine kommt (Mitchell et al., 1973). Des Weiteren kommt es durch GSH-Depletion zur Induktion von oxidativem Stress, der besonders auf Mitochondrien gravierende Auswirkungen hat (siehe Kap. 1.3.3).

Mitochondrien spielen auch bei der Paracetamol-induzierten Hepatoxizität eine zentrale Rolle. Nach Paracetamol-Überdosis werden eine verminderte mitochondriale Atmung und verstärkter oxidativer Stress beobachtet (Jaeschke, 1990; Meyers et al., 1988). Die vermehrte Bildung von Superoxid führt zur Generation des starken Oxidanz Peroxinitrit in Mitochondrien (Cover et al., 2005). Dieser oxidative Stress bewirkt, zusammen mit von Lysosomen freigesetztem Eisen (Kon et al., 2010), die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP), was den Kollaps des Membranpotentials und die Beendigung der ATP-Synthese zur Folge hat (Kon et al., 2004; Masubuchi et al., 2005; Ramachandran et al., 2011b). Durch die von oxidativen Stress ausgelöste mitochondriale Dysfunktion kommt es zur Freisetzung von mitochondrialen Intermembran-Proteinen wie Endonuclease G und Apoptose-induzierendem Faktor (AIF). Die Endonuclease G fragmentiert Kern-DNA wodurch letztlich der Tod der Leberzellen durch Nekrose besiegelt wird (Bajt et al., 2006; Jaeschke et al., 2014).

Die entscheidende Rolle von oxidativem Stress bei der Paracetamol-induzierten Hepatoxizität zeigt sich auch darin, dass die Behandlung mit dem Antioxidans GSH oder *N*-Acetylcystein (NAC), einem Medikament, dass in Hepatozyten zu GSA metabolisiert wird, eine protektive Wirkung hat (James et al., 2003b; Knight et al., 2002; Saito et al., 2010).

Des Weiteren ist die Hepatotoxizität in Mäusen mit reduzierter Aktivität von SOD2, einem für das Abfangen von mitochondrialem Superoxid zuständigen Protein, verstärkt. (Fujimoto et al., 2009; Ramachandran et al., 2011a).

### *Inflammatorische Stress Hypothese*

Eine Hypothese für die Entstehung von ideosynkratischem Medikamenten-induziertem Leberschaden ist, dass inflammatorischer Stress – hervorgerufen durch exogene oder endogene Inflammagene – einen Suszeptibilitätsfaktor für iDILI darstellt (Deng et al., 2009). Inflammatorischer Stress kann durch verschiedenste Faktoren wie beispielsweise virale oder bakterielle Infektionen, Zelltod oder Störungen der intestinalen mikrobiellen Barriere hervorgerufen werden (Ganey et al., 2004).

Im bekanntesten Tiermodell für idiosynkratische Hepatotoxizität werden iDILI-verursachende Medikamente zusammen mit Lipopolysaccharid (LPS) verabreicht. Das Endotoxin LPS ist Bestandteil der gram-negativen Bakterienzellwand und kann durch Translokation vom Gastrointestinaltrakt in das Blut und damit in die Leber gelangen. Verschiedene Medikamente, von denen bekannt ist, dass sie im Menschen iDILI verursachen können, wie beispielsweise Trovofloxacin (TVX), Ranitidin, Sulindac, Chlorpromazin, Halothan, Amiodaron und Diclofenac zeigen auch in Nagern, wenn sie zusammen mit LPS verabreicht werden, hepatotoxische Effekte (Buchweitz et al., 2002; Cheng et al., 2009a; Deng et al., 2006; Lu et al., 2012; Luyendyk et al., 2003; Shaw et al., 2007; Waring et al., 2006; Zou et al., 2009). Medikamente der gleichen pharmakologischen Klasse, die aber nicht mit ideosynkratischen Reaktionen assoziiert sind, führten in diesem Modell nicht zu Hepatotoxizität (Luyendyk et al., 2003; Waring et al., 2006). Die Selektivität dieses Modells spricht für eine Rolle von inflammatorischem Stress bei der Entstehung von ideosynkratischem Medikamenten-induziertem Leberschaden.

Neben LPS rufen auch Komponenten der gram-positiven bakteriellen Zellwand wie Peptidoglycan oder Lipoteichonsäure, wenn sie mit TVX koadministriert werden, eine verstärkte Hepatotoxizität des Medikaments hervor (Shaw et al., 2009a).

Da gleichzeitige virale Infektionen einen Risikofaktor für die Entwicklung von adversen Medikamenten-Reaktionen darstellen, untersuchten Cheng und Kollegen den Einfluss des viralen RNA-Mimetikums PolyI:C auf die Halothan-induzierte Leberschädigung

(Cheng et al., 2009). Das Narkotikum Halothan verursacht in ca. 20 % der Patienten eine leichte Schädigung der Leber und führt in einem kleinen Prozentsatz zu schwerer Hepatotoxizität die häufig in fulminantem Leberversagen endet (Wright et al., 1975). PolyI:C ähnelt strukturell doppelsträngiger RNA, wie sie in einigen Viren vorkommt. Durch Interaktion mit TLR3 (engl.: *toll-like receptor 3*) auf B Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen werden Immunantworten ausgelöst, die denen von viralen Infektionen ähnlich sind. In der Leber von Mäusen verursacht die PolyI:C-Behandlung, durch von Kupffer Zellen sekretiertes Interleukin (IL) 12 vermittelt, eine Rekrutierung und Aktivierung von NK Zellen (Dong et al., 2004). Das synthetische RNA-Analogon PolyI:C kann, je nach Zeitpunkt der Verabreichung einen verminderten oder verstärkenden Einfluss auf den Halothan-induzierten Leberschaden ausüben. Wird PolyI:C nach Halothan-Behandlung verabreicht, führt dies zu verstärktem Leberschaden, der durch den Apoptose-Inhibitor z-VAD-fmk weitgehend inhibiert werden kann. Weiterhin ist die Aktivierung von Kupffer und NK Zellen verstärkt und verschiedene pro-apoptotische Faktoren wie FasL und TNF sind hochreguliert. Die Depletion von TNF, Kupffer Zellen oder NK Zellen resultiert in einer signifikanten Reduktion des verstärkten Leberschaden (Cheng et al., 2009a).

Modelle, die inflammatorischen Stress – ausgelöst durch Bakterien oder Viren selbst und nicht nur durch limitierte Antigene derselben – mit Medikamenten-Gabe kombinieren um idiosynkratische Hepatotoxizität nachzuahmen, könnten folglich helfen, um die zugrundeliegenden Mechanismen von DILI noch besser aufzuklären.

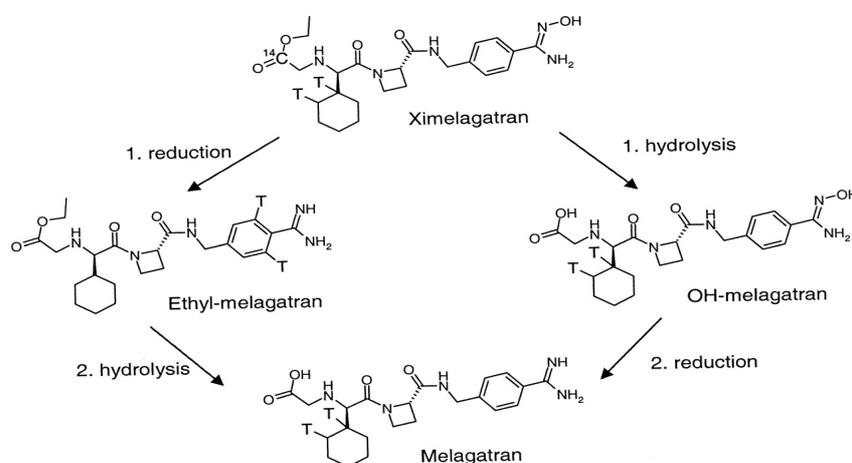
## 1.4 Ximelagatran

Ximelagatran (XIM) ist ein direkter, oral verfügbarer Thrombininhibitor, der Anfang des Jahres 2004 vom Pharmakonzern AstraZeneca unter dem Handelsnamen Exanta<sup>®</sup> auf den europäischen Markt gebracht wurde. Im Februar 2006 erfolgte die Marktrücknahme, da XIM bei Einnahme über einen längeren Zeitraum (>35 Tage) bei einigen Patienten zu idiosynkratischem Medikamenten-induziertem Leberschaden führte. In 7,9 % der Patienten wurden Erhöhungen der Alanin-Aminotransferase (ALT) im Blut nachgewiesen, was auf eine lebertoxische Eigenschaft des Thrombininhibitors hinweist (Lee et al.,

2005). Bisher ist der Mechanismus, der zur Leberschädigung durch XIM führt, weitestgehend unbekannt.

### 1.4.1 Metabolismus

Nach oraler Administration wird XIM schnell vom Dünndarm absorbiert, ins Blut überführt und in der Leber metabolisiert. Das Pro-Drug XIM besitzt einen Amidoxim- und einen Ester-Teil und wird in zwei Schritten über die beiden Intermediate Ethyl-Melagatran und Hydroxy-Melagatran in seine aktive Form Melagatran (MEL) überführt (Abb. 1).



**Abb. 1: Metabolismus von Ximelagatran zu Melagatran**

XIM wird in zwei Schritten, entweder durch Reduktion und Hydrolyse (links) oder durch Hydrolyse und Reduktion (rechts) zu Melagatran metabolisiert (Eriksson et al., 2003).

Bisher wurde ein Enzymsystem identifiziert, dass N-hydroxylierte Derivate/Pro-Drugs mit stark basischen funktionellen Gruppen wie XM reduziert (Andersson et al., 2005; Krompholz et al., 2012). Dieses N-Hydroxylamin-Reduktase System ist in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und besteht aus drei Komponenten: CYB5B (Cytochrom *b*5), mARC (engl.: *mitochondrial amidoxime reducing component 2*) und einer bisher unbekanntem CPB5B-Reduktase (Clement and Lopian, 2003; Neve et al., 2012).

Da die Bioverfügbarkeit von MEL ist mit 3-7 % sehr gering ist wird das 170-fach lipophile Pro-Drug XIM verabreicht. Dessen Bioverfügbarkeit liegt beim Menschen bei etwa 20 % (Gustafsson et al., 2001). In Nagern ist die Bioverfügbarkeit mit 5-10 % wesentlich

geringer (Eriksson et al., 2003). Im Menschen hat MEL eine Halbwertszeit von 2,4 bis 4,6 Stunden, erreicht die höchste Plasmakonzentration 1,5 bis 2,5 Stunden nach oraler XIM-Einnahme und wird primär über die Nieren ausgeschieden (Brighton, 2004).

#### **1.4.2 Wirkmechanismus**

Bei MEL, der aktiven Form des Pro-Drug XIM, handelt es sich um einen direkten und kompetitiven Inhibitor von Thrombin, dem zentralen Mediator der Koagulation. MEL ähnelt strukturell einer Peptidsequenz auf der  $\alpha$  Kette von Fibrinogen, wodurch es reversibel an die aktive Stelle von  $\alpha$ -Thrombin binden kann und dessen Funktion inhibiert (Kaplan, 2003). Durch die Bindung an freies als auch an Blutgerinnsel gebundenes Thrombin kann Fibrinogen nicht mehr zu Fibrin umgesetzt werden und das Fortschreiten der Gerinnungskaskade wird effektiv verhindert (Weitz, 2003).

#### **1.4.3 Pathomechanismus**

Wie bei vielen leberschädigenden Medikamenten lieferten präklinische toxikologische Studien keinen Hinweis auf die hepatotoxische Eigenschaft von XIM. Erst klinische Phase III Langzeitstudien zeigten, dass XIM die Leber stärker schädigt als der Vitamin K Antagonist Warfarin. In der THRIVE Studie lag die Wahrscheinlichkeit von ALT-Erhöhungen in der Warfarin-Gruppe bei 2 % während sie in der XIM-Gruppe mit 9,6 % fast fünfmal so groß war (Fiessinger et al., 2005). Auch in den Phase III Studien SPORTIF III und V wiesen 6 % der mit XIM-behandelten Patienten erhöhte ALT-Werte auf, verglichen mit ca. 1 % der Kontrollgruppe (Albers et al., 2005; Olsson and Executive Steering Committee of the SPORTIF III Investigators, 2003). Die Schädigung der Leber trat 1-6 Monate nach Therapiebeginn ein und resultierte bei wenigen Patienten (<1-2 %) in einer abnormalen Funktion der Leber.

Erste Hinweise auf eine möglicherweise immunogenetische Pathogenese lieferte 2008 eine pharmakogenetische Studie, die zeigte, dass erhöhte ALT-Werte mit den MHC Allelen DRB1(\*)07 und DQA1(\*)02 assoziiert sind (Kindmark et al., 2008).

Allerdings konnten verschiedene *in vitro* Modelle mit humanen Hepatoma-Zelllinien oder *ex vivo* Studien mit primären humanen oder murinen Hepatozyten den zellulären Mechanismus der XIM-induzierten Toxizität nicht aufklären (Ainscow et al., 2008a; Kenne et al., 2008). Diese Studien fokussierten sich vornehmlich auf die Untersuchung der direk-

ten Toxizität auf Zellen oder deren Analyse anhand von morphologischen Gesichtspunkten wie beispielsweise die Form von Mitochondrien.

Eine funktionelle Analyse zeigte, dass XIM die mitochondriale Atmung und den Redoxstatus von Zellen bereits in Konzentrationen, die (noch) keinen Einfluss auf das Überleben von Hepatozyten haben, beeinflusst. XIM reduziert dosisabhängig den GSH-Level von Hepatozyten und verschiebt den Redoxstatus in Richtung Oxidation. Weiterhin werden sowohl der basale als auch den maximale Sauerstoffverbrauch von Mitochondrien durch das Medikament vermindert. Die Schädigung der mitochondrialen Atmung, der veränderte Redoxstatus und die reduzierten GSH-Level deuten auf oxidativen Stress durch mitotoxische Metabolite hin (Neve et al., 2015).

## 2 FRAGESTELLUNG

Da die Leber das zentrale Organ für den Metabolismus und die Eliminierung körperfremder Substanzen ist, ist sie besonders anfällig gegenüber Schädigungen durch Medikamente. Gleichzeitig gelangen Krankheitserreger durch das Blut in das Organ und können zu Veränderungen in die Homöostase von hepatischen Immun- und Gewebe-Zellen führen. Aus epidemiologischen Studien ist bekannt, dass Infektionen mit Viren die Wahrscheinlichkeit zur Entwicklung eines Medikamenten-induzierten Leberschaden erhöhen und Tiermodelle liefern Hinweise darauf, dass Inflammation durch LPS oder das RNA-Mimetikum PolyI:C als Auslöser fungieren können. Das Medikament XIM wurde aufgrund von Leberschädigung vom pharmazeutischen Markt genommen. Bisher konnte der Mechanismus der XIM-vermittelten Hepatotoxizität nicht aufgeklärt werden. Auch war bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt, ob gleichzeitige virale Infektionen einen Risikofaktor für die Entwicklung von XIM-induziertem Leberschaden darstellen und wie dieser auf molekularer Ebene abläuft.

Daraus ergaben sich die folgenden zentralen Fragen:

- Stellen hepatische Virusinfektionen einen Risikofaktor für die Genese eines Leberschadens durch XIM dar?
- Kann auch das bakterielle Endotoxin LPS die hepatotoxische Wirkung von XIM induzieren?
- Welche Immunzellen tragen zur verstärkten Toxizität von XIM nach Virusinfektion bei?
- Gibt es ein zentrales Zytokin, das die erhöhte Leberschädigung vermittelt?
- Durch welche Art von Zelltod sterben die Leberzellen und hat die Verabreichung spezifischer Inhibitoren einen protektiven Effekt?
- Sind mitochondriale Schädigungen für die gesteigerte Toxizität von XIM bei Virusinfektion verantwortlich?

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte

Analysewaagen	PT 600, CP 224 S-OCE, CD 2201 (Sartorius, Göttingen)
Blotsystem	Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
Brutschränke	Hera cell, Hera cell 240 (Heraeus, Hanau)
Douce Homogenisator	Homogenizer cylinder 15 ml (Sartorius, Göttingen)
Eismaschine	Icematic (Scotsman®, Frimont Bettolinc, Pogliano, Italien)
Geweindeflaschen	100 ml, 250 ml, 500 ml, 1 l, 2 l (Schott, Mainz)
Heizblock	Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg)
IVIS System	<i>In Vivo</i> Imaging System 200 (PerkinElmer, Waltham, USA)
Kühlschränke (+ 4 °C)	Economic cooler (Bosch, Stuttgart), Liebherr premium, Liebherr comfort (Liebherr, Biberach)
Kamera	ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
Kühlschränke (-20 °C)	Liebherr comfort (Liebherr, Biberach)
Kühlschränke (-80 °C)	Hera freeze (Heraeus, Hanau)
Magnetrührer	Heidolph MR 3002 (Heidolph Electro GmpH, Keilheim)
Messzylinder	50 ml, 100 ml, 500 ml, 1 l, Rotilabo (Carl Roth, Karlsruhe)
pH-Meter	pH 523 (WTW, Weilheim)
Laufkammer	Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
Perfusionspumpe	Masterflex (Cole-Parmer Instrument Company via Nomodi rect, Keht/Rhein)
Pipetten	0,2-2 µl, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl (Gibson, Villiers-le-Bel, Frankreich; Eppendorf, Hamburg) Transferpipette (Brand, Wertheim)

Pipettierhilfe	Matrix Technologies CellMate® (Thermo Scientific, Waltham, USA)
Präparationsbesteck	Labotec, Labor-Technik, Göttingen
Potter	Potter S Homogenizer (Sartorius, Göttingen)
Reflexionsphotometer	Reflotron® Plus (Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz)
Reinstwasseranlage	NANOpure Diamond, Barnstead (Werner Reinstwassersysteme, Leverkusen)
Restrainer	Universität Bonn, Abt. Feinmechanik
Rotoren	#6445 (Heraeus, Hanau), SW32 03U501 (Beckmann Coulter, Palo Alto, USA)
Schüttler	Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg)
Schüttelwasserbad	GFL 1092 (GFL, Burgwedel)
Sonifikator, Stab-	UW2070/Sonoplus (Bandeln electronic, Berlin)
Spektralphotometer	Nanodrop ND-1000 (PiqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
Stromquelle (Western Blot)	PowerPac 300 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
Tecan Reader	Tecan, Männedorf, Schweiz
Ultrazentrifuge	Optima™ LE-80K (Beckmann Coulter, Palo Alto, USA)
Vortexer	VWR Reagenzglasschüttler (VWR International GmbH, Darmstadt)
Wasserbäder	TW8 (Julabo, Seelach)
Werkbank, steril	Hera safe (Heraeus, Hanau)
Zählkammer	Neubauer (La Fontaine über Labotec, Labor Technik, Göttingen)
Zentrifugen	Multifuge 3s-f, Biofuge fresco (Heraeus, Hanau)

### **3.1.2 Verbrauchsmaterialien**

ALT Messstreifen	Reflotron® ALT (Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz)
Deckgläschen	21x46 mm (Marienfeld, Lauda-Königshofen)
Dialyse-Kammer	Slide-A-Lyzer (Thermo Scientific, Rockford, USA)
Einmalröhrchen	15 ml, 50 ml, PP-Röhrchen, (Greiner bio-one, Solingen)

Filterpapier	Whatmen Chromatography Paper (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)
Glaskanülen, heparinisiert	Capilette for Reflotron 32 ml (Selzer Labortechnik, Waghäusel), Mikro-HK-Kapillaren (Brand GmbH, Wert heim)
Handschuhe, einmal	DermaClean, Hygrip (Ansell, Brüssel, Belgien)
Insulinspritzen	0,5 ml, 1 ml (BD Microlance, Heidelberg)
Kanülen	0,4x19 mm (grau), 0,5x22 mm (weiß), 0,6x25 mm (blau) (BD Microlance, Heidelberg)
Küvetten	Einwegküvetten (VWR Interantional GmbH, Darmstadt)
Messpipetten	2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (Greiner Labortechnik, Nürtingen)
Mikrotiterplatten	12 Loch (Nunc, Wiesbaden), 96 Loch (bio-one, Solingen)
OP-Maske	Foliodress mask (Hartmann, Heidenheim)
Parafilm	Parafilm „M“ (Amerikan National Can TM, Grennwich, USA)
PVDF Membran	Polyvinylidenfluoride Membran (Amersham über GE Healthcare, Little Chalfont, UK)
Pasteurpipetten	150 mm, 230 mm (Carl Roth, Karlsruhe)
Reaktionsgefäße	0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml (Sarstedt, Nümbrecht)
Schlundsonde	25 mm (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg)
Skalpell	Feather, Osaka, Japan
Spritzen	1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml BD Discardit™ II (BD, Heidelberg)
Ultrazentrifugenröhrchen	14x89 mm (Beckmann Coulter, Palo Alto, USA)
Zellkulturplatten	150x20 mm (Sarstedt, Nümbrecht)
Zellkulturflaschen	25 cm (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz)

### 3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

AZD0837 (AZD)	AstraZeneca, London, UK
Bovines Serum Albumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe

Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Cäsiumchlorid	Applichem, Darmstadt
Dabigatranetexilat (DAB)	Boehringer Ingelheim, Ingelheim
DMEM-Medium	Gibco, BRL, Karlsruhe
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol, absolut	Applichem, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
Fructose	Carl Roth, Karlsruhe
Glutamin (200 mM)	Cambrex, Verviers, Belgien
Glycin (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
LPS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
2-Merkaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Isofluran	DeltaSelect, Pfullingen
Melagatran (MEL)	AstraZeneca, London, UK
Milchpulver	Applichem, Darmstadt
Luziferin	Caliper Lifesciences, Rüsselsheim
Natriumcitrat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Fluka, Buchs
PBS	Biochrom, Berlin
Penicillin (10.000 U/ml)/ Streptomycin (10 mg/ml)	PAA, Pasching, Österreich
Percoll	Amersham über GE Healthcare, Freiburg
Proteingrößenstandard	Fermentas, St. Leon-Rot
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
SDS	Carl Roth, Karlsruhe
TES	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
TNF	Invitrogen, Karlsruhe

Trypanblau	Serva, Heidelberg
Tween-20	Merck, Darmstadt
Ximelagatran (XIM)	AstraZeneca, London, UK

### 3.1.4 Allgemeine Lösungen

Kochsalzlösung	9 g/l NaCl (Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen)
Fruktose	6,667 g Fruktose 10 ml A. bidest.

#### *Medikamente*

AZD0837 (AZD)	210 mg AZD0838 10 ml A. bidest.
Dabigatran (DAB)	150 mg Dabigatran etexilat 10 ml A. bidest.
Melagatran (MEL)	50 mg Melagatran 10 ml A. bidest.
Trovafoxacin (TVX)	15 mg Trovafoxacin 1 ml A. bidest.
Ximelagatran (XIM) (Stammlösung)	142 mg/ml Ximelagatran pH 3,0-3,3

#### *Medien*

Zelllinien-Medium	DMEM high Glucose (4500mg/l) 8 % (v/v) FCS 5 ml L-Glutamin 0,1 g/l Streptomycin 105 U Penicillin
-------------------	--

### 3.1.5 Puffer

Blockpuffer	10 % (w/v) Milchpulver TBS/T
-------------	---------------------------------

Cäsiumchlorid (CsCl) Lösung	10 mM Tris/HCl, pH 7,8 20 mM MgCl <sub>2</sub> Dichte 1,25: + 36,16 g/100 ml CsCl Dichte 1,34: + 51,2 g/100 ml CsCl Dichte 1,40: + 62 g/100 ml CsCl
Citratpuffer	100 mM Natriumcitrat pH 6,0
Dialysepuffer	30 g/l Saccharose 8,77 g/l NaCl 2,03g g/l MgCl <sub>2</sub> 10 ml/l 1 M Tris/HCl pH 7,8 pH 7,8
hypotonischer Extraktionspuffer	25 mM HEPES pH 7,5 5 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM EGTA 1 mM Pefablock 1 µg/ml Pepstatin 1 µg/ml Leupeptin 1 µg/ml Aprotinin
IP-Puffer mit BSA	0,3 M Sucrose 5 mM TES 0,2 mM EGTA 0,1 % (w/v) BSA pH 6,9
IP-Puffer ohne BSA	0,3 M Saccharose 5 mM TES 0,2 mM EGTA pH 6,9
IPP-Puffer	0,3 M Saccharose 10 mM TES

	0,2 mM EGTA
	0,1 % (w/v) BSA
	pH 7,2
Lysepuffer (Western Blot)	SDS-Laufpuffer
	60 mg/ml DTT
Probenpuffer (5x) (Western Blot)	0,58 M Saccharose
	4 % (w/v) SDS
	0,04 % (w/v) Bromphenolblau
	62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8
Sammelgel 3,7% (Western Blot)	1,23 ml 30 % (v/v) Acrylamid
	5,8 ml A. bidest.
	2,5 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
	100 µl 10 % SDS
	250 µl 3 % APS
	8 µl TEMED
SDS-Laufpuffer (Western Blot)	3 g Tris
	14,4 g Glycin
	1 g SDS
	ad 1 l A. bidest.
TBS/T (Tris buffered saline/Tween)	2,42 g Tris
	8 g NaCl
	0,1 % (v/v) Tween-20
	ad 1 l A. bidest.
	pH 7,6
Towbin Puffer	SDS-Laufpuffer
	20 % (v/v) Methanol
Trenngel 12 % (Western Blot)	8 ml 30 % Acrylamid
	6,49 ml A. bidest.
	5 ml 1,5 M Tris/HCL, pH 8,8
	200 µl 10 % SDS
	300 µl 3 % APS

	10 µl TEMED
Trypanblaulösung (10x)	10 % (w/v) Trypanblau
	PBS
Viruspuffer	10 mM Tris/HCL
	20 mM MgCl <sub>2</sub>
	pH 7,8
PBS (phosphate buffered saline)	80 g/l NaCl
	0,2 g/l KCl
	1,44 g/l NaHPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O
	0,2 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	(Fa. Biochrom, Berlin)
Schwellungs-Puffer	0,2 M Saccharose
	10 mM MOPS-Tris
	5 mM Succinate
	1 mM Pi
	10 µM EGTA
	2 µM Rotenon

### 3.1.6 Kit Systeme

Alle Kit Systeme wurden, soweit nicht anders angegeben, nach Herstellerangaben verwendet.

Caspase-Glo Assay Kit	Promega, Fitchburg, USA
ECL Chemiluminescent Detection Kit	Amersham über GE Healthcare, Freiburg
DC™ Protein Assay Kit	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

### 3.1.7 Antikörper

NK1.1	für in vivo Depletion verwendet, Isotyp Ig G2a κ (Maus), Klon PK 136, eigene Herstellung
-------	--

### 3.1.8 Western Blot Antikörper

CHOP	Cell Signaling, Danvers, USA
------	------------------------------

GRP78	Cell Signaling, Danvers, USA
Beta-Aktin	Sigma-Aldrich, Steinheim

### 3.1.9 Inhibitoren

Pan-Caspase Q-VD-OPH	Biovision, Mountain View, USA
----------------------	-------------------------------

### 3.1.10 Viren

Adeno-GOL (AdGOL)	adenoviraler Vektor, E1 und E3 deletiert, Expression von OVA, GFP und Luziferase unter einem CMV-Promotor (eigene Herstellung)
LCMV	Lymphocytic Choriomeningitis Virus, Wildtyp Virus (Armstrong Stamm), von Dr. Dirk Wohlleber zur Verfügung gestellt

### 3.1.11 Zelllinien

HEK 293	HEK 293 Zellen (engl.: Human Embryonic Kidney), generiert aus humanen embryonalen Nierenzellen durch Transformation mit Adenovirus Typ 5 (Graham et al., 1977).
---------	---

### 3.1.12 Mauslinien

C57/BL/6	Wildtyp Mäuse, Inzuchtstamm mit dem MHC I Haplotyp H-2b
TNF-R1/2-/-	Knockout des TNF Rezeptors 1 und 2, Stamm auf C57BL/6 Hintergrund (aus eigener Zucht).
rag2 <sup>-/-</sup>	RAG (engl.: <i>recombination-activating gene</i> ) 2 Knockout, Stamm auf C57BL/6 Hintergrund. Durch fehlende V(D)J Rekombination werden keine reifen B oder T Lymphocyten gebildet (Shinkai et al., 1992) (aus eigener Zucht).

Die Knockout Linien wurden unter SPF Bedingungen (engl.: *specific pathogen free*) im Haus für Experimentelle Therapie (HET) oder in den Instituten für Molekulare Medizin und Experimentelle Immunologie (IMMEI) am Universitätsklinikum Bonn gezüchtet und gehalten. Die Wildtyp Mäuse wurden von Janvier Labs (Saint Berthevin, Frankreich) bezo-

gen. Alle Mäuse waren zu Beginn der Experimente zwischen 6 und 12 Wochen alt und wogen 20 bis 25 g.

## **3.2 Methoden**

### **3.3 Western Blot**

Der Western Blot ermöglicht es Proteine, die zuvor in elektrophoretisch aufgetrennt wurden, auf eine Trägermembran zu transferieren. Durch die Immobilisierung auf der Membran wird der immunologische Nachweis bestimmter Proteine mit Hilfe von Antikörpern ermöglicht.

#### **3.3.1 Probengewinnung**

Nach der Leberentnahme wurden mit einem Skalpell ca. 2 mm große Quader Lebergewebe mittig aus dem großen Leberlappen herausgetrennt. Die Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

Die Leberstücke wurden mit Hilfe eines Gewebestempels in 150 µl Lysepuffer aufgeschlossen. Anschließend wurden die Proben 5 s mit einem Ultraschallstab beschallt um DNA zu zerkleinern. Überschüssige Gewebereste wurden für 5 min bei 13000 rpm sedimentiert, und der Überstand bis zur weiteren Analyse bei -20 °C weggefroren.

#### **3.3.2 Proteinbestimmung**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte kolorimetrisch mit dem *DC*<sup>™</sup> Protein Assay Kit. Dazu wurden 1:10 Verdünnungen der Proben mit PBS hergestellt. Zu 5 µl der verdünnten Probe wurden 125 µl Lösung A und 1 ml Lösung B gegeben. Nach 15 minütiger Inkubation im Dunkeln erfolgte die Vermessung der optischen Dichte bei 750 nm.

### **3.3.3 SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)**

Proteingemische können mittels SDS-PAGE in einer Gelmatrix elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt werden.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit einem Polyacrylamidgel, welches aus Sammel- und Trenngel aufgebaut war. Das Trenngel hatte einen Acrylamid-Gehalt von 12 % und wurde nach dem Gießen mit *A. bidest.* überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Wasser entfernt und das Sammelgel mit einem Acrylamid-Gehalt von 3,7 % darauf gegossen. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Gel in die Laufkammer gestellt und diese mit SDS-Laufpuffer aufgefüllt.

Nach der Proteinbestimmung (Kap. 3.3.2) wurden die Proben mit reduzierendem Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C auf dem Heizblock inkubiert um Disulfidbrücken aufzulösen. Anschließend wurden 20 µg Protein in Probenpuffer in die Taschen pipettiert. Als Größenstandard dienten 5 µl PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder. Die Elektrophorese fand bei 90 bis 140 V für 2-3 h statt.

### **3.3.4 Blot**

Die im Acrylamidgel der Größe nach aufgetrennten Proteine wurden in einem semi-dry Blotsystem auf eine Whatman-Membran übertragen. Die Membran aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) wurde nach dem Befreuchten mit Methanol in Towbin Puffer äquilibriert. Das Filterpapier wurde ebenfalls in Towbin Puffer getränkt. Anschließend wurden drei Lagen Filterpapier, Membran, Gel und drei weitere Lagen Filterpapier luftblasenfrei in der Blottingkammer übereinander geschichtet. Der elektrophoretische Transfer fand für 30 min bei 10 V statt.

### **3.3.5 Antikörpermarkierung und Detektion**

Die auf die Membran transferierten Proteine können mit spezifischen Antikörpern detektiert werden. Zuvor wurden freie Proteinbindungsstellen der Membran durch einstündige Inkubation in Blockpuffer abgesättigt.

Die Detektion erfolgte mit einem antigenspezifischen Primär- und einem HRP- (engl.: *horseradish peroxidase*) gekoppelten Sekundärantikörper. Die Inkubationszeit der Membran in Primärantikörper-Blockpuffer-Lösung betrug zwischen einer Stunde (bei Raumtemperatur) und zwei Tagen (bei 5°C). Anschließend wurde die Membran fünfmal für

8 min in TBS/T gewaschen und eine Stunde bei Raumtemperatur in Sekundärantikörper-Blockpuffer Lösung inkubiert. Die Antikörperkonzentrationen im Blockpuffer betragen jeweils 1:1000. Um ungebundene Sekundärantikörper von der Membran zu entfernen, wurde die Membran erneut gründlich mit Waschpuffer gereinigt.

Kommt die Merrettich-Peroxidase des Sekundärantikörper in Kontakt mit Wasserstoffperoxid, wird Licht in Form von Chemolumineszenz emittiert. Dieses kann mittels Röntgenfilm oder mit Hilfe einer Kamera detektiert werden. Für die Detektion des Sekundärantikörpers wurde das Chemiluminescent Detection Kit verwendet und die Lichtemission mit der Kamera dokumentiert.

### **3.4 In vivo Experimente in Mäusen**

#### **3.4.1 Verabreichung von Medikamenten**

Zur peroralen Verabreichung von Medikamenten wurden Mäuse in der linken Hand fixiert und die Medikamente mit Hilfe einer Schlundsonde direkt in den Magen gegeben. Es wurden pro Maus entweder 1 mg XIM, 3 mg DAB, 1,5 mg MEL, 4,2 mg AZD, oder 3 mg TVX in 200  $\mu$ l *A. bidest.* verabreicht.

#### *Zur Dosierung von XIM*

Die Dosierung von Medikamenten wird häufig auf das Körpergewicht bezogen. Jedoch unterscheidet sich die Größe der Leber – dem zentralen Stoffwechselorgan für Medikamente – bei Mensch und Maus deutlich. Beträgt der prozentuale Anteil der Leber bei Mäusen etwa 5 % des Körpergewichtes, so sind es beim Menschen nur ca. 2 % (etwa 1,2 g Leber bei 20 g Maus im Vergleich zu 1,5 kg Leber bei einem Durchschnittsgewicht von 72 kg beim Menschen). Daher ist bei der Maus eine höhere Dosierung bezogen auf das Körpergewicht notwendig, um – bezogen auf das Lebergewicht – die gleiche Dosis zu verabreichen. Des Weiteren ist die Bioverfügbarkeit von XIM in Nagern mit 5-10 % geringer als beim Menschen (20 %) (Eriksson et al., 2003). Daher wurde eine Dosis von 50 mg XIM/kg ( $\hat{=}$  1 mg/Maus) gewählt, die verglichen mit 1 mg XIM/kg beim Menschen ( $\hat{=}$  72 mg/Mensch) deutlich höher liegt.

### **3.4.2 Infektion von Mäusen mit Viren**

Alle verwendeten rekombinanten Adenoviren wurden von Dr. Dirk Wohlleber (IMI, TU München) generiert. Das Adenovirus AdGOL exprimiert das grün fluoreszierende Protein (GFP), Ovalbumin (OVA) und Luciferase unter dem CMV Promotor und ist durch die Deletion der Gene E1 und E3 *in vivo* nicht zur Replikation fähig (Stabenow et al., 2010; Wohlleber et al., 2012b). Beim Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV) handelt es sich um den Armstrong Stamm des Wildtypvirus. Dieser wurde ebenfalls von Dr. Dirk Wohlleber zur Verfügung gestellt.

Zur Infektion von Mäusen wurden die Viren in Kochsalzlösung verdünnt und in 150 µl NaCl intravenös in die Schwanzvene gespritzt. Die Mäuse wurden mit  $5 \times 10^8$  PFU/Maus bzw.  $1 \times 10^9$  PFU/Maus AdGOL oder mit  $1 \times 10^5$  PFU/Maus LCMV infiziert.

### **3.4.3 Intraperitoneale Applikation von Substanzen**

Um Substanzen intraperitoneal zu verabreichen wurden die Mäuse mit der linken Hand fixiert und mit dem Kopf leicht nach unten gehalten. Fell und Bauchhaut wurden mit einer Kanüle auf Höhe des Darms durchstochen und pro Maus 0,5 mg pan-Caspase Inhibitor, 0,5 mg NK1.1 Antikörper, 1 mg LPS oder 200 mg Fructose/Maus in 300 µl *A. bidest.* verabreicht.

### **3.4.4 Intravenöse Applikation von TNF**

Nach Erwärmen unter Rotlicht wurden die Mäuse im Restraîner fixiert, der Schwanz mit Ethanol gereinigt und 400 ng TNF in 150 µl PBS in die Schwanzvene injiziert.

### **3.4.5 Messung des Leberschadens**

Zur Bestimmung des Leberschadens wurde der Alanin-Aminotransferase (ALT) Wert im Blut bestimmt. Dazu wurde die Mäuse im Restraîner fixiert, die Schwanzvene leicht mit einem Skalpell angeritzt und 32 µl Blut in eine heparinisierte Kapillare aufgenommen. Das Blut wurde auf einen ALT-Messstreifen gegeben und der Leberschaden im Reflexionsphotometer gemessen. Bei ALT-Werten über 1000 U/l wurden Verdünnungen mit PBS eingemessen.

### 3.4.6 Überlebensversuche

Zur Erstellung von Kaplan-Meier-Plots wurde das Überleben von Mäusen nach verschiedenen Behandlungen untersucht. Die Gruppengröße betrug zwischen 4 und 7 Tieren. Wenn die Abbruchkriterien erfüllt, oder das Ende des Versuches erreicht war, wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation oder durch Begasung mit CO<sub>2</sub> getötet.

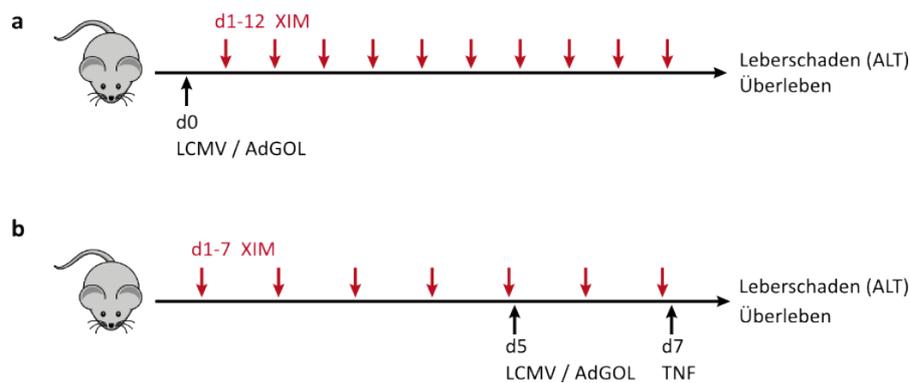
### 3.4.7 Leberentnahme

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation oder durch Begasung mit CO<sub>2</sub> getötet. Das Fell wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gereinigt, der Bauchraum geöffnet und die Leber entnommen.

### 3.4.8 Experimentelles Design der *in vivo* Versuche mit XIM

Für die Untersuchung des durch XIM verstärkten Leberschadens wurden zwei experimentelle Setups verwendet (siehe **Abb. 2**).

Das Grundschema des experimentellen Aufbaues blieb in den verschiedenen Versuchen unverändert. Die Mäuse wurden entweder zuerst mit LCMV oder Adenovirus infiziert (Kap. 3.4.2) und anschließend mit XIM behandelt (Kap. 3.4.1) und das Überleben (Kap. 3.4.6) und der Leberschaden durch Bestimmung der ALT im Blut (Kap. 3.4.5) determiniert (**Abb. 2a**) oder die Verabreichung von XIM (siehe Kap. 3.4.1) fand vor und nach der Infektion mit dem Virus (Kap. 3.4.2) statt und an Tag 7 wurde TNF injiziert (Kap. 3.4.4) und der



**Abb. 2: Experimentelles Setup der *in vivo* Modelle für XIM-induzierten Leberschaden.**

**a)** Männliche C57BL/6 Wt-Mäuse wurden an d0 entweder mit  $1 \times 10^5$  PFU LCMV oder  $5 \times 10^8$  bzw.  $1 \times 10^9$  PFU AdGOL i.v. infiziert. Ab d1 wurden die Mäuse täglich mit 1 mg XIM/Maus p.o. behandelt und der Leberschaden durch Messung der ALT im Blut sowie das Überleben determiniert. In **(b)** wurden die Mäuse von d1 bis d7 täglich mit 1 mg XIM/Maus p.o. gefüttert und an d5 mit LCMV ( $1 \times 10^5$  PFU/Maus) oder AdGOL ( $5 \times 10^8$  PFU oder  $1 \times 10^9$  PFU/Maus) i.v. infiziert. An d7 erfolgte 1 h 50 min nach der letzten XIM-Gabe die i.v. Injektion von 400 ng TNF. Der Leberschaden wurde 0 h, 2 h und 4 h nach TNF durch Bestimmung der ALT im Blut gemessen.

Leberschaden (Kap. 3.4.5) und das Überleben (Kap. 3.4.6) bestimmt (**Abb. 2b**).

### 3.5 Leberhistologie

Zunächst wurde eine Kanüle in die Portalvene (*Vena portae*) der Leber eingeführt. Nach Durchtrennung der *Vena cava*, erfolgte die Perfusion für 1 min mit 4 % Paraformaldehyd in PBS (pH 6,9).

Nach Entnahme wurde der große Leberlappen (*Lobus dexter*) mit dem Skalpell in ca. 3 mm breite Streifen geschnitten. Die mittleren Schnitte wurden für mindestens 48 h in 4 % Paraformaldehyd fixiert und danach bei 4 °C in 0,4 % Paraformaldehyd in PBS gelagert. Die angefertigten Schnitte wurden HE (Hämatoxylin Eosin) gefärbt. Die Einbettung in Paraffin, sowie die Anfertigung der Schnitte erfolgte am Institut für Molekulare Immunologie/Experimentelle Onkologie an der Technischen Universität München. Die mikroskopische Auswertung fand am Institut für Virologie an der Technischen Universität München statt.

### **3.6 Caspase Assay**

Die Bestimmung der Caspaseaktivität erfolgte mit dem Caspase-Glo Assay Kit. Aktivierte Caspase spalten ein prolumineszentes Substrat, welches in der Folge mit Luziferase reagiert, wodurch es zur Emission von Chemolumineszenz kommt. Die Stärke des lumineszenten Signals lässt somit Schlüsse auf die Aktivierung der Caspasen zu.

Leberstücke von ca. 3x3 mm Größe wurden mit einem Gewebestempel in 200 µl hypotonischem Extraktionspuffer homogenisiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 15 min bei 13000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß mit 300 µl Extraktionspuffer überführt und gut vermischt. Die Proben wurden bei -80 °C gelagert.

Nach der Proteinbestimmung (Kap. 3.3.2) wurden die Proben in zwei Verdünnungsschritten mit Extraktionspuffer auf 20 µg/ml eingestellt.

In einer 96 Well Flachbodenplatte mit weißen Wänden und weißem Boden (Bio-Rad) wurden in Anschluss 50 µl Caspase Glo Reagenz und 50 µl 20 µg/ml Proteinprobe vermischt und für 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Lumineszenz erfolgte am Tecan Reader.

Die Bestimmung der Caspaseaktivität der Proben erfolgte mit Hilfe von Duplikaten. Für die Auswertung wurde das arithmetische Mittel gebildet. Als Blindwert dienten Proben bei denen nur Extraktionspuffer zugefügt wurde.

### **3.7 Bestimmung der Prothrombinzeit von Blut**

Für die Bestimmung der Koagulationszeit von Blut wurde männlichen C57BL/6 Mäusen mit einer Spritze Blut aus der Schwanzvene entnommen. Damit es nicht zur Gerinnung des Blutes kommt, wurden zuvor 10 % des geplanten Entnahmevolumen an Citratpuffer in einer Insulinspritze ohne Totvolumen vorgelegt. Die Proben wurden für 5 min bei 10000 rpm und 10 °C sedimentiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zum vollständigen Entfernen aller Erythrozyten wurde der Zentrifugationsschritt wiederholt und das gewonnene Plasma bei -20 °C gelagert. Die Analyse der Proben wurde von Marco Dorn, Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Bonn, vorgenommen. Die Gerinnungsanalyse erfolgte am Kugelko-

agulator. Dabei handelt es sich um eine halbautomatische mechanische Bestimmung des Gerinnungsendpunktes. Bei dieser Methode wird der Zeitpunkt bis zur Fibrinbildung automatisch gemessen.

### **3.8 Isolation von Mitochondrien aus der Mausleber**

Mauslebern wurden ohne Perfusion entnommen und nach Entfernen der Gallenblase in Reaktionsgefäße mit 30 ml eiskalten IP-Puffer mit BSA überführt. Anschließend wurden je 2 Lebern einer Gruppe in einen Douce Homogenisator mit 15 ml eiskaltem IP-Puffer mit BSA gegeben. Dieser wurde in den Potter eingespannt und die Lebern im Eisbad bei 800 U/min zerkleinert. Dazu wurde der Stempel einmal vollständig herab- und heraufbewegt. Das Homogenat wurde 10 min bei 800 g und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde erneut 10 min bei 800 g und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand in der Ultrazentrifuge 10 min bei 9000 g und 4 °C sedimentiert. Das Pellet wurde in 1 ml eiskaltem IP-Puffer mit BSA resuspendiert.

Im Anschluss erfolgte die Auftrennung der Bestandteile mit Hilfe eines Percoll-Gradienten. Der Gradient bestand aus 3 Schichten zu je 8 ml. Die unterste Schicht enthielt 60 % (v/v) Percoll in IPP-Puffer mit 0,75 M Saccharose. Der mittlere Gradient hatte einen Percollgehalt von 30 % (v/v) in IPP-Puffer mit 0,43 M Saccharose. Die oberste Schicht verfügte über einen Percollanteil von 18 % (v/v) in IPP-Puffer mit 0,37 M Saccharose. Das in IP-Puffer mit BSA resuspendierte Pellet wurde vorsichtig auf den Gradienten gegeben und 10 min bei 9000 g und 4°C zentrifugiert. Mit der Pasteurpipette wurde die Bande zwischen dem mittleren und unteren Gradienten entnommen und in 50 ml IP-Puffer ohne BSA verdünnt. Ab diesem Schritt wurde Puffer ohne BSA verwendet, da die Proteinbestimmung ansonsten nicht möglich ist. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 10 min bei 9000 g und 4 °C. Falls sich das Mitochondrien-Pellet noch leicht vom Boden des Reaktionsgefäßes lösen ließ, also noch zu viel Percoll enthielt, wurde die Zentrifugation wiederholt. Am Ende der Isolation wurden die Mitochondrien vorsichtig in 1 ml IP-Puffer ohne BSA resuspendiert und auf Eis gelagert.

Für die Proteinbestimmung (Kap. 3.3.2) wurden 5 µl einer 1:10 Verdünnung in IP-Puffer ohne BSA verwendet.

### **3.9 Ex vivo Behandlung von Mitochondrien mit XIM**

Nach der Proteinbestimmung wurden 200 µg XIM zu 10 mg der isolierten Mitochondrien in 1 ml IP-Puffer ohne BSA gegeben. Als Kontrolle diente Carrier, der über den gleichen pH-Wert wie XIM verfügte. Anschließend wurden die Ansätze für 30 min bei 37°C unter gelegentlichem Schütteln im Wasserbad inkubiert und danach sofort auf Eis gelagert. Die Mitochondrien wurden für 10 min bei 9000 g und 4°C abzentrifugiert und vorsichtig in IP-Puffer ohne BSA resuspendiert.

### **3.10 Membranpotential und Anschwellen von Mitochondrien**

Wenn Mitochondrien mit einer pathologischen Menge an Calcium behandelt werden kommt es zur Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP) (Martinou et al., 2000; Rizzuto and Pozzan, 2006; Giacomello et al., 2007). Durch die geöffnete mPTP gelangt Saccharose, welche im Puffer in hoher Konzentration vorliegt, in die Mitochondrien. In der Folge kommt es durch Osmose zum Nachstrom von H<sub>2</sub>O wodurch die Mitochondrien anschwellen und ihr Membranpotential verlieren. Das Anschwellen der Mitochondrien führt dazu, dass ihre Absorption von Licht reduziert wird, detektierbar als Verringerung der optischen Dichte bei 540 nm. Durch Zugabe des membranpermeablen, kationischen, grünfluoreszierenden Farbstoff Rhodamin 123 (Rh123) kann der Verlust des Membranpotentials untersucht werden. Von gesunden Mitochondrien mit stabil hohem Membranpotential wird Rh123 aufgrund seiner Ladung aufgenommen. Im Innern der Mitochondrien kommt es zum Quenching der Fluoreszenz. Bei Depolarisierung der Membran tritt Rh123 aus den Mitochondrien aus und das fluoreszente Signal nimmt zu.

Das Protonophor Carbonylcyanid-4-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazon (FCCP) ist ein Entkoppler der mitochondrialen Atmung und Phosphorylierung. Durch Inkubation der Mitochondrien mit FCCP wird der Transport von Protonen in das Mitochondrium erhöht und das mitochondriale Membranpotential bricht zusammen. Die Messung der Fluoreszenz nach Depolarisierung der Membran mittels FCCP dient als Positivkontrolle. Cyclosporin A (CsA) inhibiert die Öffnung der mPTP und dient als Negativkontrolle.

Für die Messung von Membranpotential und Schwellung der Mitochondrien wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Stammlösungen und Puffer verwendet.

**Tab. 1: Verwendete Stammlösungen für die Herstellung des Schwellungs-Puffers und zur Bestimmung des Membranpotentials bzw. der Schwellung der Mitochondrien**

Stammlösungen		
	Endkonzentration	Lagerung (°C)
Saccharose	1 M	-20
Tris	2 M	4
MOPS-Tris	0,5 M	4
Succinate	0,25 mM	4
P <sub>i</sub> (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	1 M	4
EGTA	100 mM	4
Rotenon	2 mM	-20
CaCl <sub>2</sub> Dihydrat	1 M	4
CsA	1 mM	-20
Rhodamin 123	1 mM	-20
FCCP	1 mM	-20

Aus den Stammlösungen wurde der Schwellungs-Puffer (SWP) (siehe Tab. 2) hergestellt. Der Puffer wurde bei -20°C gelagert. Die Zugabe von Rotenon erfolgte erst kurz vor der Verwendung.

**Tab. 2: Zusammensetzung des Schwellungs-Puffers**

SWP			
	100 ml	Stammlösung	Endkonzentration
Saccharose	20 ml	1 M	0,2 M
MOPS-Tris	2 ml	0,5 M	10 mM
Succinate	2 ml	0,25 M	5 mM
P <sub>i</sub>	100 µl	1 M	1 mM
EGTA	10 µl	100 mM	10 µM
Rotenon	1:1000	2 mM	2 µM

Zur Untersuchung des Membranpotentials und der Schwellung wurden die Stammlösungen mit Schwellungs-Puffer verdünnt (siehe Tab. 3).

**Tab. 3: Verdünnungen der Stammlösungen, die zur Untersuchung von Membranpotential bzw. Schwellung der Mitochondrien benötigt werden und Endkonzentration in der Platte.**

	Stammlösung	Verdünnung	Endkonzentration	Menge/ Vertiefung	Konzentration/ Vertiefung
<b>Rh123</b>	1 mM	1:2000	500 nM	50 µl	125 nM
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	1 M	1:2500	400 µM	50 µl	100 µM
<b>CsA</b>	1 mM	1:50	20 µM	50 µl	5 µM
<b>FCCP</b>	1 mM	1:200	10 µM	20 µl	1 µM

Zur Messung des Membranpotentials und der Schwellung wurde eine schwarze Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen und durchsichtigem Boden verwendet. Mit Hilfe einer abgeschnittenen gelben Spitze wurden 150 µg Mitochondrien in 25 µl IP-Puffer ohne BSA/Vertiefung vorgelegt. Anschließend wurden die Verdünnungen der Stammlösungen (siehe Tab. 3) von Rhodamin 123 (125 nM Rh123 in 50 µl SWP/Vertiefung) und Calcium (100 µM Ca<sup>2+</sup> in 50 µl SWP/Vertiefung) hinzugegeben und mit 75 µl SWP auf 200 µl Gesamtvolumen aufgefüllt.

Bei allen Gruppen wurden verschiedene Kontrollansätze mitgeführt:

- 1) Nur Puffer
- 2) Nur Mitochondrien
- 3) Nur Rhodamin 123
- 4) Nur Mitochondrien und Rhodamin 123
- 5) Zusätzlich mit CsA (1 µM CsA in 50 µl SWP/Vertiefung) zur Inhibition der MPTP (Negativkontrolle)
- 6) Zusätzlich mit FCCP (1 µM FCCP in 20 µl SWP/Vertiefung) zur Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung (Positivkontrolle)

Alle Ansätze wurden mit SWP auf 200 µl/Vertiefung aufgefüllt.

Zur Untersuchung der mitochondrialen Schwellung wurde die optische Dichte bei 540 nm gemessen. Die Änderung des Membranpotentials wurde bei 485/20 nm (Exzitation) und 528/20 nm (Emission) detektiert. Die Messungen erfolgen alle 30 s über einen Zeitraum von 100 min mit kurzem Schütteln zwischen den Messungen am Tecan Reader.

Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten. Für die Auswertung wurde das arithmetische Mittel der detektierten Werte verwendet.

### **3.11 *In vivo* Biolumineszenz nach AdGOL Infektion**

Zur Entstehung von Biolumineszenz kommt es wenn das Enzym Luziferase das Substrat Luziferin abhängig von Sauerstoff zu Oxyluziferin umsetzt. Bei dieser Reaktion kommt es zur Freisetzung von Energie in Form von Photonen. Diese können mit einer CCD (engl.: *cooled charge-coupled device*) Kamera detektiert und optisch dargestellt werden. Um die Infektionseffizienz nach Adenovirusinfektion (siehe Kap. 3.4.2) zu untersuchen, wurde das *In Vivo* Imaging System verwendet. Das verwendete Adenovirus AdGOL exprimiert Luziferase unter dem CMV-Promotor. Das Maß der Luziferinumsetzung lässt somit direkte Rückschlüsse auf die Viruslast in den Leberzellen zu.

Männliche C57BL/6 Mäuse wurden intravenös entweder mit  $5 \times 10^8$  PFU/Maus oder mit  $1 \times 10^9$  PFU/Maus AdGOL infiziert und nach 24 h im IVIS System vermessen. Zur Quantifizierung der Infektion wurden den Mäusen intraperitoneal 2,5 mg Luziferin gespritzt und nach 5 Min unter Narkose mit Isofluran wurde die *in vivo* Biolumineszenz gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Living Image 2.50 (Caliper LifeScience).

### **3.12 Zellzahlbestimmung**

Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:10 verdünnt und 10  $\mu$ l in eine Neubauer Zählkammer pipettiert. Es wurden die leben, d.h. nur die nicht blau verfärbten Zellen in den 16 kleinen Außenquadraten gezählt. Zur Berechnung der Zellzahl wurde folgende Formel verwendet:

Zellzahl / ml = Anzahl der gezählten Zellen / (4 x Verdünnungsfaktor x  $10^4$ )

### **3.13 Herstellung von Adenoviren**

HEK 293 Zellen wurden in Zellkulturplatten bis zu einer Konfluenz von 80 % in Zelllinien-Medium kultiviert und mit  $1 \times 10^8$  pfu/Schale des jeweiligen Adenovirus infiziert. Nach 36-48 h Kultivierung bei 37 °C wurden die Zellen durch festes seitliches Klopfen an die Schalen abgelöst. Die Zellen wurden bei 1500 rpm für 10 min bei 4 °C sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 0,5 ml/Schale Viruspuffer aufgenommen. Zum Herauslösen des Virus aus den Zellen wurde die Zellsuspension dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Wasserbad bei 37°C wieder aufgetaut. Im Anschluss wurde die Suspension für 10 min bei 4000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde erneut für 10 min bei 4000 rpm und 4°C sedimentiert und der Viruspartikel enthaltende Überstand für die Ultrazentrifugation verwendet.

#### **3.13.1 Ultrazentrifugation**

In einem Ultrazentrifugenröhrchen wurden 2,5 ml Cäsiumchlorid 1,25 mit 2,5 ml CsCl 1,4 unterschichtet. Darauf wurde vorsichtig 6 ml Viruslösung pipettiert und das Röhrchen mit Viruspuffer bis zu Rand aufgefüllt. Die Zentrifugation fand für 60 min bei 35000 rpm und 10 °C statt. Anschließend wurde die untere milchig-trübe Virusbande entnommen. Dazu wurde das Röhrchen mit einer Kanüle durchstoßen und die Band vorsichtig abgesaugt. Im zweiten Auftreinigungs-schritt wurden 8 ml CsCl 1,34 in ein Ultrazentrifugenröhrchen gegeben, die Viruslösung vorsichtig darauf pipettiert und mit Viruspuffer bis zum Rand aufgefüllt. Im Anschluss an die Zentrifugation bei 30000 rpm für 18 h bei 10 °C wurde die untere opaque Virusbande erneut durch Punktion mit einer Kanüle entnommen.

#### **3.13.2 Dialyse**

Die Viruslösung wurde mit einer Kanüle in eine zuvor mit Dialyse-Puffer benetzte Dialyse-Kammer gespritzt und in Dialyse-Puffer gelegt. Die Dialyse erfolgte für 4,5 h unter Rühren bei 4 °C. Der Puffer wurde das erste Mal nach 30 min und dann alle 60 min ausgetauscht. Die Viruslösung wurde mittels einer Spritze entnommen, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### 3.13.3 Virustitration

Für die Titration des Virus wurden  $2,5 \times 10^5$  HEK 293 Zellen in 1 ml Zellkultivierungs-Medium in einer Platte mit 12 Vertiefungen für 18-24 h bei 37 °C bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert. Es wurde eine Verdünnungsreihe des zu untersuchenden Virus hergestellt. Dazu wurden jeweils 30 µl, 10 µl, 3 µl oder 1 µl Viruslösung in die obere Reihe der Platte gegeben. Anschließend wurden je 10 µl aus dem jeweiligen Loch der oberen Reihe in das Loch der mittleren Reihe pipettiert. Dies entspricht 0,3 µl, 0,1 µl, 0,03 µl und 0,01 µl Viruslösung pro Vertiefung.

Nach Inkubation für 48 h wurde die Viruskonzentration zur Berechnung verwendet, bei der sich noch alle Zellen vom Boden abgelöst haben. Mit Hilfe von Tab. 4 lässt sich die Viruskonzentration der titrierten Viruslösung bestimmen.

**Tab. 4: Berechnung der Viruskonzentration mittels eingesetzter Viruslösung**

Menge der Viruslösung	Viruskonzentration
30 µl	$1,7 \times 10^8$ IU/ml
10 µl	$5 \times 10^8$ IU/ml
3 µl	$1,7 \times 10^9$ IU/ml
1 µl	$5 \times 10^9$ IU/ml
0,3 µl	$1,7 \times 10^{10}$ IU/ml
0,1 µl	$5 \times 10^{10}$ IU/ml
0,03 µl	$1,7 \times 10^{11}$ IU/ml
0,01 µl	$5 \times 10^{11}$ IU/ml

### 3.14 Statistik

Alle Experimente wurden mindestens zweimal durchgeführt. Die Gruppengröße der *in vivo* Versuche lag bei 3-7 Tieren. Die Fehlerabweichung wurde als Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit Hilfe des zweiseitigen Student's t-Test mit dem Programm Prism 5 (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Etablierung eines *in vivo* Modells für iDILI

Das seltene Auftreten idiosynkratischer Reaktionen und deren Abhängigkeit von individuellen Risikofaktoren hat zur Folge, dass iDILI derzeit in verwendeten präklinischen Sicherheitstest mit konventionellen Tierversuchen häufig unbemerkt bleibt. Bessere Vorhersagemodelle für iDILI würden die präklinische Identifikation von iDILI-auslösenden Substanzen ermöglichen und könnten helfen, den Mechanismus der Leberschädigung aufzuklären (Roth and Ganey, 2011).

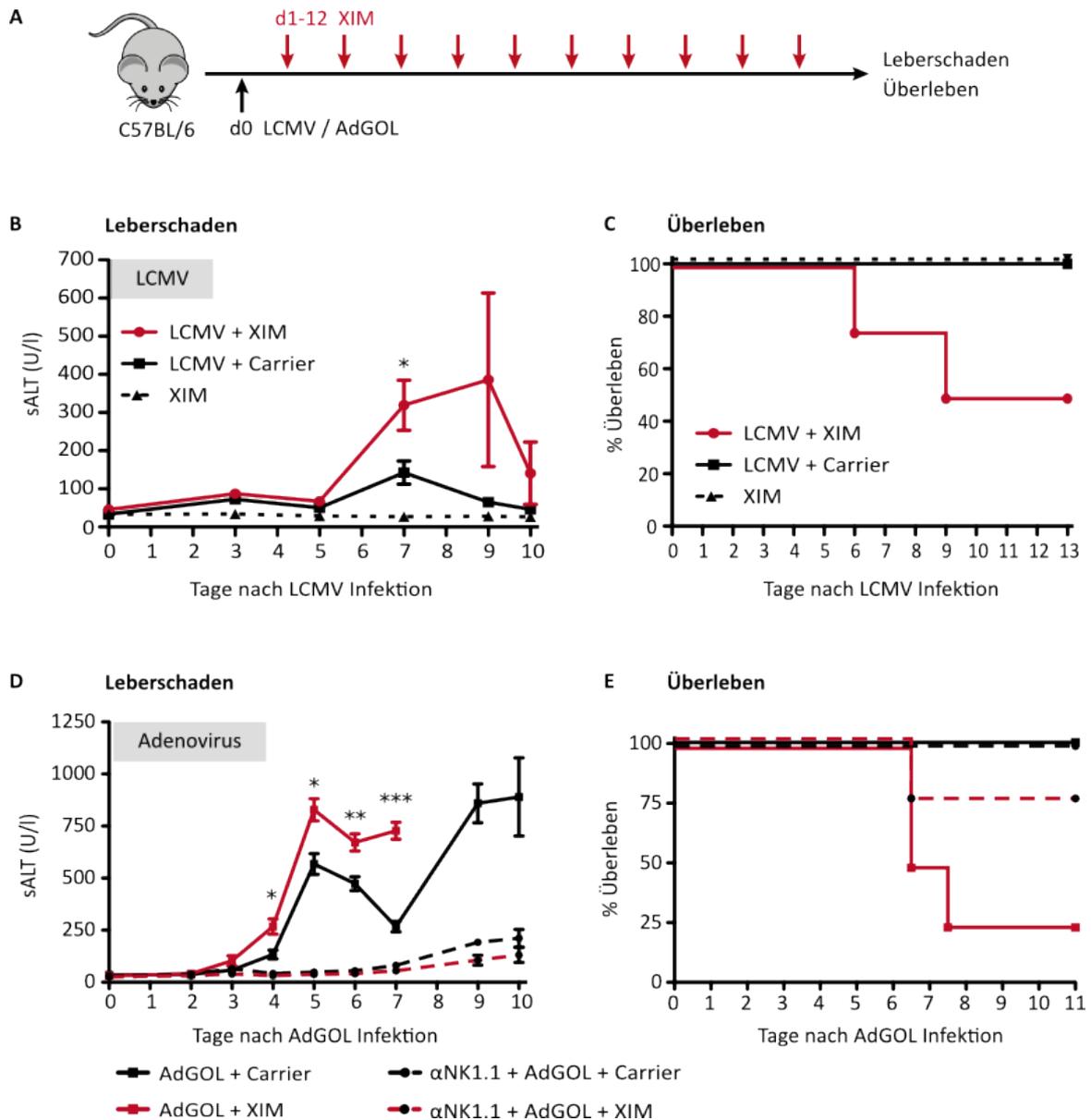
Der Mechanismus Leberschädigung durch XIM ist bisher nicht bekannt. Weder in *in vitro* Studien mit humanen Hepatom-Zelllinien noch in *ex vivo* Studien mit humanen Hepatocyten wies XIM toxische Effekte auf (Kenne et al., 2008; Ainscow et al., 2008b). Möglicherweise zeigte sich die Hepatotoxizität durch die komplexe Struktur der Leber und der vielfältigen Interaktion von Immunzellen mit Leberzellpopulationen daher erst in *in vivo*. Denn erst in Langzeitstudien von über 35 Tagen wurde ersichtlich, dass XIM in 7,9 % der Patienten zu erhöhten Leberwerten führte (Agnelli et al., 2009; Keisu and Andersson, 2010). Daher wurde für die Untersuchung von XIM-assoziiertem iDILI ein *in vivo* Mausmodell mit längerer Expositionsdauer entwickelt. Zu den Risikofaktoren für die Entwicklung für iDILI zählen neben genetischen Prädispositionen und Umweltfaktoren auch Infektionen (CHALASANI and BJÖRNSSON, 2010). Die Häufigkeit eine Medikamenten-induzierte Leberschädigung zu entwickeln ist in HIV, Hepatitis B, Hepatitis C oder Hepatitis B/C koinfizierten Menschen signifikant erhöht (Ungo et al., 1998; den Brinker et al., 2000; Wong et al., 2000; Bonacini, 2004; Kim et al., 2016).

Daher wurde ein Mausmodell entwickelt (Abb. 3a), bei dem die Tiere entweder mit dem RNA-Einzelstrangvirus LCMV oder dem Adenovirus Serotyp 5, einem replikationsdefizienten rekombinanten DNA-Doppelstrangvirus infiziert wurden (siehe Kap. 3.1.10). Im Anschluss daran erfolgte die tägliche perorale Behandlung der Mäuse mit XIM (siehe Kap. 3.4.1). Als Kontrolle wurde Carrier-Lösung mit dem gleichen pH-Wert wie XIM ver-

abreicht. Durch Messung der Alanin-Aminotransferase (ALT) im Blut, die vor allem im Zytoplasma der Hepatozyten vorkommt und bei deren Zerstörung ins Blut freigesetzt wird, kann eine direkte Aussage über das Ausmaß der Leberschädigung getroffen werden. Des Weiteren wurde die Überlebensrate der Mäuse bestimmt. Da NK und NKT Zellen sowie CTL eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung viraler Infektionen haben, wurde untersucht, ob sie auch bei der XIM-vermittelten Leberschädigung involviert sind. Der pan-NK-Marker NK1.1 wird auf murinen NK und NKT Zellen exprimiert (Lanier et al., 1986; Albert Bendelac et al., 1997). Zudem wird die Expression von NK1.1 nach Virusinfektion auf CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T Lymphocyten (CTL) hochreguliert (Kambayashi et al., 2000; McMahon and Raulet, 2001; M K Slifka, 2000; Assarsson et al., 2000). In einem Teil der Mäuse fand 1 Tag vor Virusinfektion und darauf folgend alle 2 Tage durch Verabreichung eines Antikörpers die Depletion der NK1.1-positiven Zellen statt.

Bei LCMV/Carrier-Mäusen zeigten sich ein Anstieg der ALT-Werte im Blut nach Tag 5 (**Abb. 3b**). Die höchste Leberschädigung war am 7. Tag erreicht, anschließend sanken die Werte wieder. Bei Mäusen die zusätzlich mit XIM behandelt wurden, war der Leberschaden an Tag 7 signifikant erhöht. Auch an Tag 9 nach Infektion zeigten sich höhere ALT-Werte. Die alleinige Verabreichung von XIM führte über den gesamten Zeitraum zu keiner verstärkten Freisetzung von ALT ins Blut. Im Kaplan-Meier Graph zeigte sich nach 9 Tagen eine Sterberate von 50 % der LCMV/XIM-Mäuse (**Abb. 3c**). Weder Mäuse der Carrier-Vergleichsgruppe noch die nur mit XIM-behandelten Mäuse starben. Die mit AdGOL-infizierten Mäuse zeigten ähnliche Ergebnisse wie die LCMV-infizierten Tiere. Die AdGOL/XIM-Mäuse wiesen im Verlauf der Infektion eine höhere Leberschädigung, detektiert als Serum-ALT, auf (**Abb. 3d**) und die Mortalität lag bei 75 % (**Abb. 3e**).

Die zusätzliche Depletion von NK und NKT Zellen sowie CTL durch Verabreichung des NK1.1 Antikörpers vor und während des Versuches inhibierte die Leberschädigung bei XIM- und Carrier-behandelten Virus-infizierten Mäusen fast vollständig (**Abb. 3d**) und verhinderte das Sterben der Virus-infizierten XIM-Mäuse (**Abb. 3e**).



**Abb. 3: XIM verstärkt den Leberschaden in Virus-infizierten Mäusen.**

a) Schematische Darstellung des experimentellen Designs. Männliche C57BL/6 Mäuse wurden an Tag 0 mit  $1 \times 10^5$  PFU LCMV oder  $5 \times 10^8$  PFU AdGOL i.v. infiziert. Ab Tag 1 wurden die Mäuse täglich mit XIM (1 mg/Maus/d) oder Carrier p. o. behandelt und die ALT im Blut bestimmt. (b) Zeigt die Leberschädigung im Verlauf der Zeit bei LCMV Infektion. In (c) ist das prozentuale Überleben der Mäuse im Kaplan-Meier Graph dargestellt. (d) Stellt die Leberschädigung gegen die Zeit ab dem Zeitpunkt der AdGOL Infektion dar. (e) Zeigt das prozentuale Überleben der AdGOL-infizierten Mäuse im Kaplan-Meier Graph. In (d und e) erfolgte zusätzlich die Depletion von NK1.1-positiven Zellen 1 Tag vor Virusinfektion und anschließend alle 2 Tage wurden den Mäusen  $50 \mu\text{g}$  NK1.1 Antikörper i. p. gespritzt. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente mit 4 Mäusen pro Gruppe. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

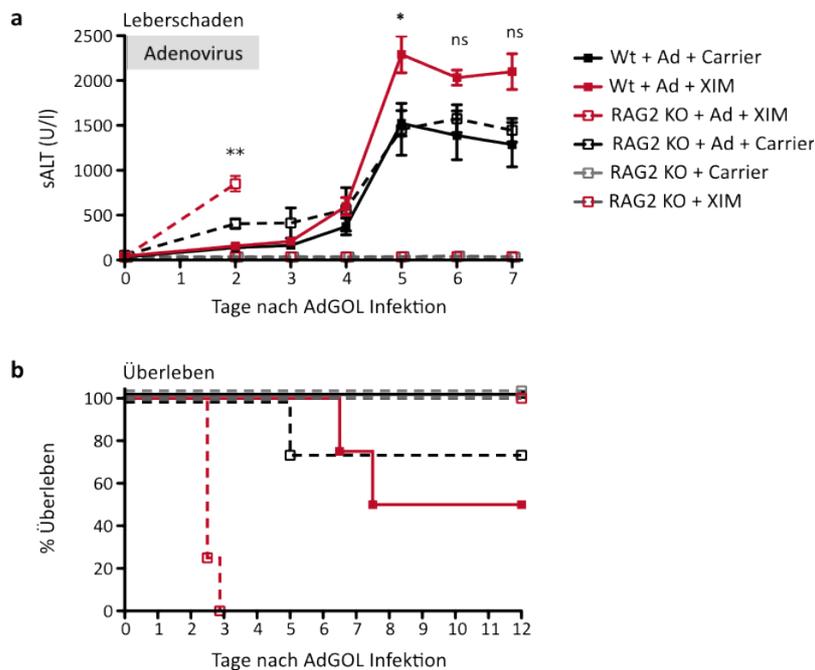
Das hier vorgestellte *in vivo* Modell für XIM-induzierten Leberschaden ist unabhängig vom verwendeten Virustyp. Sowohl die mit dem RNA-Virus LCMV- als auch die mit dem DNA-Virus AdGOL-infizierten Mäuse entwickeln durch Behandlung mit XIM einen erhöhten Leberschaden, der mit einer 50-75%igen Letalität der kobehandelten Mäuse einhergeht. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass unerkannte virale Erkrankungen der Leber, beispielsweise durch HEV, bei der Entwicklung der XIM-induzierten Hepatotoxizität im Menschen involviert waren.

Durch Depletion von NK/T Zellen und CTL wurde der Leberschaden und die Letalität inhibiert. NK/T Zellen und CTL erkennen Virus-infizierte Zellen, sezernieren unter anderem die Zytokine IFN $\gamma$  und TNF und töten infizierte Zellen ab (siehe Kap. 1.1.5). Daher wurde die Rolle dieser Immunzellen im Modell für XIM-induzierte Leberschädigung (engl.: *Ximelagatran-induced Liver injury*, XIM-DILI) mit Hilfe von  $rag2^{-/-}$  und TNF-R1/2 $^{-/-}$  Mäusen näher untersucht (siehe Kap. Fehler: Referenz nicht gefunden und Kap 4.3).

## 4.2 Keine Protektion vor XIM-DILI in $rag2^{-/-}$ Mäusen

Um die Rolle von NK/T Zellen und CTL bei XIM-DILI zu untersuchen, wurden  $rag2^{-/-}$  Mäuse verwendet. Durch fehlende V(D)J Rekombination sind die Tiere unter anderem nicht fähig reife NKT Zellen oder CTL zu produzieren (Shinkai et al., 1992). NK Zellen sind im Gegensatz dazu mit einem Set von Keimbahn-codierten Rezeptoren ausgestattet, dessen Expression nicht von RAG Proteinen abhängt. Daher haben  $rag2^{-/-}$  Mäuse nahezu die gleiche Anzahl von NK Zellen ohne generelle funktionelle Defizite (Mombaerts et al., 1994).  $Rag2^{-/-}$  Mäuse wurden mit AdGOL infiziert und XIM ab dem nächsten Tag mittels Schlundsonde verabreicht (siehe Kap. 3.4). Als Kontrollen dienten Wt-Mäuse und Carrier-behandelte Tiere. Wie auch in Kap. 4.1 beobachtet, war der Leberschaden der XIM-Wt-Mäuse höher als bei den Carrier-Wt-Mäusen (**Abb 4a**). Zudem starben 50 % der XIM-Mäuse innerhalb von 8 Tagen nach Infektion (**Abb. 4b**). Es wurden keine Unterschiede zwischen  $rag2^{-/-}$  und Wt-Mäusen beobachtet, wenn sie mit Carrier behandelt wurden. Im klaren Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der XIM-Mäuse: XIM-behandelte  $rag2^{-/-}$

Tiere wiesen an Tag 2 nach Infektion eine deutlich erhöhte Leberschädigung auf und am 3. Tag der Infektion zeigte sich eine Letalität von 100 % (**Abb. 4b**).



**Abb. 4: Verstärkter Leberschaden und Letalität in rag2<sup>-/-</sup> Mäusen nach AdGOL Infektion und XIM-Behandlung.**

Männliche rag2<sup>-/-</sup> Mäuse wurden mit 5x10<sup>8</sup> PFU AdGOL i.v. infiziert und ab einem Tag nach Infektionen wurde täglich 1 mg XIM oder Carrier p.o. verabreicht. Die ALT im Blut (**a**) und das Überleben (**b**) wurden bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente mit 3-4 Mäusen pro Gruppe. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test (\* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Abwesenheit von NKT Zellen und CLT Mäuse nicht vor XIM-DILI schützt, sondern im Gegenteil rag2<sup>-/-</sup> Mäuse besonders schwer von XIM-DILI betroffen sind. Da in rag2<sup>-/-</sup> Mäusen NK Zellen die einzigen Zellen sind, die Virus-infizierte Zellen eliminieren, scheinen sie möglicherweise eine bedeutende Rolle bei XIM-DILI zu übernehmen. Leber-residente NK Zellen sind Eomes-negativ und sekretieren nach Aktivierung große Mengen verschiedener Zytokine wie beispielsweise TNF (Daussy et al., 2014). Eine mögliche Erklärung für den erhöhten Leberschaden und Letalität durch XIM könnte daher die massive Freisetzung von TNF nach NK Zell-Aktivierung in Virus-infizierten rag2<sup>-/-</sup> Mäusen sein.

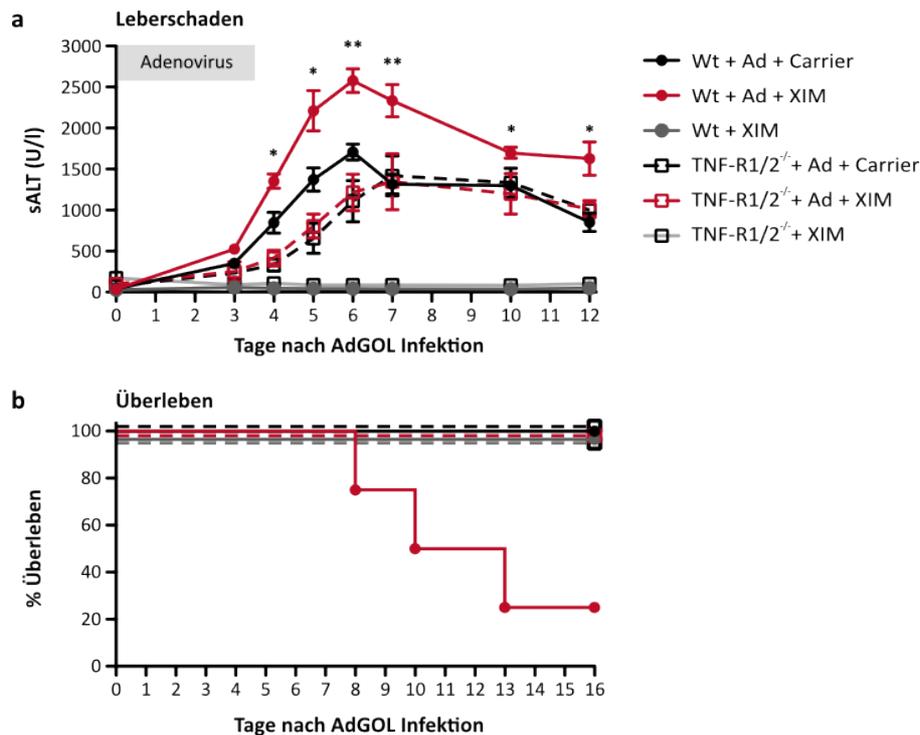
### 4.3 Die Entwicklung von XIM-DILI ist abhängig von TNF-Rezeptor1/2

Die Depletion von NK/T Zellen und CTL durch den NK1.1 Antikörper inhibierte den XIM-induzierten Leberschaden nach Virusinfektion (siehe Kap. 4.1). Besonders CTL, NK/T Zellen spielen bei der Elimination von Virus-infizierten Zellen eine entscheidende Rolle (siehe Kap. 1.1.5). CTL können den Zelltod über Perforin/Granzym-vermittelte Zytolyse, durch Fas/FasL-vermittelte Aktivierung der Apoptose oder durch Sekretion von Zytokinen auslösen. Auch hepatische NK/T Zellen übernehmen Schlüsselfunktionen bei der antiviralen Immunabwehr. Verschiedene Adhäsionsmoleküle werden auf der Oberfläche exprimiert und pro-inflammatorische Zytokine wie TNF und INF $\gamma$  sekretiert und Virus-infizierte Zellen eliminiert (Gao et al., 2009). Aktivierte NK Zellen töten Hepatozyten über TRAIL und/oder Perforin/Granzym B (Ochi et al., 2004). Die wichtigsten Effektormechanismen NKT-Zell vermittelter Leberschädigung sind die Produktion großer Mengen pro-inflammatorischer Zytokine wie INF $\gamma$  und TNF und das Töten von Hepatozyten über FasL (Biburger and Tiegs, 2005; Minagawa et al., 2004; Takeda et al., 2000). Da sowohl CTL als auch NK/T Zellen bei der endogenen Immunantwort auf virale Infektionen große Mengen des Zytokins TNF sezernieren und in Virus-infizierten Zellen auf diese Art die Apoptose induzieren, sollte die Rolle der TNF-Rezeptoren 1/2 im Modell für XIM-DILI untersucht werden.

Daher wurde die XIM-induzierte Leberschädigung in TNF-R1/2<sup>-/-</sup> Mäusen und Wt-Mäusen verglichen. Wie in **Abb. 3a** beschrieben, wurden die Mäuse mit AdGOL infiziert, ab dem darauf folgenden Tag täglich peroral mit XIM oder Carrier behandelt und der Leberschaden und die Letalität täglich bestimmt.

Mit Adenovirus-infizierte Wt-Mäuse entwickelten ab Tag 3 einen Leberschaden, die höchste Schädigung war an Tag 6 vorhanden, anschließend ging der Leberschaden zurück. Bei Virus-infizierten Wt-Mäusen die zusätzlich mit XIM behandelt wurden, war der Leberschaden ab Tag 4 höher als in Carrier-behandelten Wt-Kontrollen und blieb im Verlauf des Experimentes bis Tag 12 signifikant erhöht. Des Weiteren wiesen die XIM-behandelten Wt-Mäuse eine Letalität von 75 % auf (**Abb. 5a/b**).

Verglichen mit den XIM/Wt-Mäusen, die einen höheren Leberschaden und eine erhöhte Letalität zeigten, waren XIM/TNF-R1/2<sup>-/-</sup> Mäuse vor dem XIM-induzierten verstärkten Leberschaden protektiert (**Abb. 5a/b**). Die ALT im Blut und die Sterblichkeit waren in Knock-out Mäusen, die mit XIM gefüttert wurden auf einem Niveau mit Carrier-behandelten Knockout Tieren.



**Abb. 5: TNF-R1/2<sup>-/-</sup> Mäuse sind vor erhöhtem Leberschaden und Letalität durch XIM protektiert.**

Männliche C57Bl/6 Wt-Mäuse oder TNF-R1/2<sup>-/-</sup> Mäuse wurden mit  $1 \times 10^9$  PFU AdGOL i.v. infiziert und ab Tag 1 nach Infektion täglich p.o. mit 1 mg XIM/Maus oder Carrier behandelt. **(a)** Stellt den Verlauf der ALT-Werte über die Zeit dar. In **(b)** ist das prozentuale Überleben der Mäuse im Kaplan-Meier Graph gezeigt. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängige Experimente mit 3-4 Mäusen pro Gruppe. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ).

Bemerkenswerter Weise entwickelten auch TNF-R1/2<sup>-/-</sup> Mäuse nach Infektionen mit Adenovirus einen Leberschaden, allerdings war dieser in Carrier-behandelten Tieren und XIM-Mäusen gleich hoch. Grund dafür könnte sein, dass CTLs die Apoptose von infizierten Hepatozyten nicht nur über TNF initiieren sondern auch über andere Mechanismen wie Perforin/Granzym vermittelte Zytolyse oder durch Fas/FasL-vermittelte Aktivierung der Apoptose. Allerdings scheinen diese Effetormechanismen nicht relevant für das Leberschaden im XIM/Virus-Modell zu sein, da die Mäuse trotz Leberschaden nicht ster-

ben. Die von XIM ausgelöste Letalität scheint folglich abhängig vom TNF-Rezeptor Signalweg zu sein.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass der TNF-Rezeptor eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung von XIM-DILI hat, da nur Virus-infizierte Mäuse, welche über diesen verfügen, eine erhöhte Leberschädigung und Letalität aufweisen. Zentrales Element der verstärkten Leberzellschädigung in XIM-Mäusen scheint folglich die Interaktion von TNF mit seinen kognaten Rezeptoren zu sein und die daraus resultierende Initiierung des Zelltods. Die Initiierung des Zelltods durch andere Effektormechanismen wie Perforin/Granzym-vermittelte Zytolyse oder Fas/FasL-vermittelte Aktivierung der Apoptose führt in Virus-infizierten Mäusen zwar zu einem Leberschaden, allerdings ist dieser für die XIM-induzierte Hepatotoxizität und Letalität nicht maßgeblich. Virale Infektionen können, genau wie bakterielle Infektionen, zu inflammatorischem Stress führen. Eine Hypothese für die Entstehung von iDILI besagt, dass inflammatorischer Stress – hervorgerufen durch exogenen oder endogene Inflammagene – einen Suszeptibilitätsfaktor für iDILI darstellt (Deng et al., 2009). Im bekanntesten Tiermodell um idiosynkratische Hepatotoxizität von Medikamenten zu untersuchen fungiert das Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) als Inflammagen und wird zusammen mit iDILI-verursachenden Medikamenten verabreicht (siehe Kap. 1.3.5). Daher wurde in folgenden Experimenten untersucht, ob XIM im LPS-Modell für iDILI ebenfalls zu einem verstärkten Leberschaden führt oder ob der Mechanismus der XIM-Hepatotoxizität ein anderer ist.

#### **4.4 Im LPS-Modell für iDILI induziert die alleinige Applikation von XIM keinen Leberschaden**

Die Inflammatorische Stress Hypothese besagt, dass durch Entzündungen hervorgerufener Stress beim Menschen die Entstehung von iDILI auslösen kann (Shaw et al., 2010). Inflammatorischer Stress kann durch eine Vielzahl von Mechanismen ausgelöst werden, wie beispielsweise Infektionen, Zelltod oder Störungen der intestinalen mikrobiellen Barriere (Ganey et al., 2004). Lipopolysaccharid (LPS), ein Bestandteil der gram-negativen Bakterienzellwand, ist ein Agens, das inflammatorischen Stress *in vivo* auslösen kann.

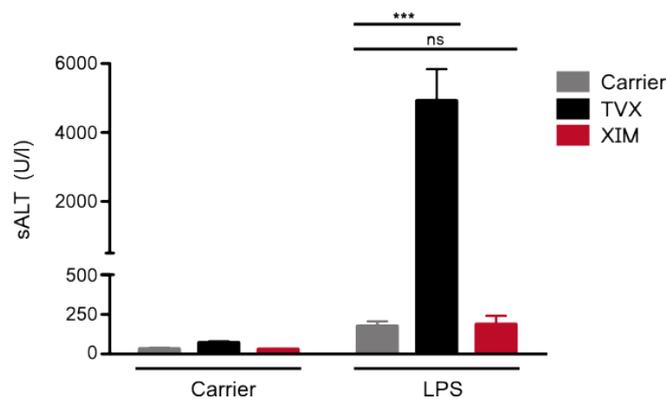
Das erste Tiermodell für idiosynkratische Hepatotoxizität wurde entwickelt, indem iDILI-  
verursachende Medikamente zusammen mit einer moderat inflammatorischen Dosis von  
LPS verabreicht wurden. Bei der Koexposition wurden sowohl nicht-toxische Dosen von  
Medikamenten als auch nicht-toxische Dosen von LPS verwendet. Im Gegensatz zum  
oben beschriebenen Modell für XIM-DILI sind die Mäuse nicht mit einem heptotropen  
Virus infiziert, sondern die alleinige Administration von LPS und iDILI-assoziiertem Medi-  
kament löst den Leberschaden aus. Verschiedene Medikamente, die in Menschen iDILI  
verursachen können, wie beispielsweise Trovofloxacin (TVX), Ranitidin, Sulindac, Chlor-  
promazin, Halothan, Amiodaron und Diclofenac zeigten hepatotoxische Effekte in Nagern  
wenn sie mit einer nicht-toxischen Dosis des Inflammagen LPS koadministriert wurden  
(Buchweitz et al., 2002; Cheng et al., 2009; Deng et al., 2006; Luyendyk et al., 2003; Wa-  
ring et al., 2006; Zou et al., 2009). Medikamente, die der gleichen pharmakologischen  
Klasse angehören, aber nicht mit idiosynkratischen adversen Medikamentenreaktionen  
assoziiert sind, führten in diesem Tiermodell nicht zu Hepatotoxizität (Luyendyk et al.,  
2003; Waring et al., 2006). Die Selektivität dieses Modells um iDILI-verursachende Medi-  
kamente zu identifizieren, spricht für eine mögliche Rolle von inflammatorischem Stress  
bei der Entstehung von humanem iDILI.

Trovofloxacin (TVX) ist ein Antibiotikum, dessen Verwendung 1999 von der Arzneimittee-  
zulassungsbehörde der USA stark eingeschränkt wurde, da es iDILI hervorrufen kann. Die  
Inzidenz von TVX-induzierter schwerer Hepatotoxizität lag bei einer von 18000 Verschrei-  
bungen und bei einer von 178000 Verschreibungen trat Leberversagen auf. Weder vorkli-  
nische Versuche noch klinischen Studien deuteten zuvor auf die lebertoxische  
Eigenschaft des Breitbandantibiotikums bei therapeutischen Dosen hin (Stahlmann,  
2002).

TVX führt in Nagern auch bei hohen Dosen nicht zu einer Schädigung der Leber (Shaw et  
al., 2007). Allerdings zeigte sich, dass die Koadministration von LPS und TVX in Mäusen  
eine signifikante Erhöhung des Leberschadens hervorruft. TVX oder LPS allein führen  
nicht zu einer Erhöhung der Plasma ALT Werte verglichen mit Kontrollmäusen. Die Leber-  
schädigung erreichte 15-21 h nach LPS-Gabe ihren Höhepunkt (Shaw et al., 2007; Waring  
et al., 2006). Histologisch zeigte sich eine zentrilobuläre hepatozelluläre Nekrose mit kol-  
labierten Sinoiden um die Zentralvene (Chen et al., 2000; Lazarczyk et al., 2001).

Da es sich bei dem Modell der Koadministration von Medikamenten mit LPS um das einzige bisher verfügbare Mausmodell handelt, bei dem verschiedene iDILI-assoziierte Medikamente eine Leberschädigung hervorrufen, wurde untersucht, ob auch XIM, wenn es mit LPS zusammen verabreicht wird, zu Hepatotoxizität führt, oder ob der Mechanismus der Leberschädigung durch XIM ein anderer ist (**Abb. 6**).

Das experimentelle Design wurde aus vorherigen Publikationen übernommen. Darin wurde gezeigt, dass eine Dosis von 3 mg TVX p. o. bei Kobehandlung mit LPS zum höchsten Leberschaden nach 15-21 h führte (Shaw et al., 2007; Shaw et al., 2009b) Daher wurden Wt-Mäusen nach 12 h Futterentzug TVX, XIM oder Carrier verabreicht und 3 h später LPS oder Carrier gespritzt. Der Leberschaden wurde 15 h nach LPS gemessen. Die alleinige Behandlung von Mäusen mit TVX, XIM oder Carrier zeigte keine toxischen Effekte (**Abb. 6**).



**Abb. 6: Vergleich von TVX/LPS mit XIM/LPS Koadministration.**

Männlichen C57BL/6 Mäusen wurden nach Entzug des Futters für 12 h entweder TVX (3 mg/Maus), XIM (1 mg/Maus) oder Carrier als Kontrolle p.o. verabreicht. Nach weiteren 3 h wurde 1 µg LPS i.p. gespritzt und das Hungern beendet. Der ALT-Wert im Blut wurde 15 h nach LPS Injektion bestimmt. Carrier= *A. bidest.*, TVX=Trovafloracin, XIM=Ximelagatran. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente mit 3-4 Mäusen pro Gruppe. Die statistische Analyse wurde mit dem zweiseitigen Student's t-Test durchgeführt (\*\*\*) =  $p \leq 0,001$ .

Die Behandlung mit LPS führte zu einem leichten Anstieg der ALT im Blut. Die Koexposition der TVX-behandelten Mäuse mit LPS erhöhte die ALT-Werte im Blut höchst signifikant, was auf parenchymalen Zellschaden der Leber schließen lässt. Dagegen führte LPS bei XIM-behandelten Mäusen zu keinem verstärktem Leberschaden. Dieser lag auf dem gleichen Niveau wie der Leberschaden der Mäuse die nur mit LPS behandelten wurden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass XIM, wenn es mit LPS zusammen verabreicht wird, anders als TVX, in Mäusen keinen Leberschaden hervorruft. Der Mechanismus durch welchen XIM zur Leberschädigung in Virus-infizierten Mäusen führt unterscheidet sich folglich vom TVX/LPS Mechanismus der Hepatotoxizität.

Im Modell der LPS-induzierten DILI ruft die alleinige Verabreichung des Inflammagen LPS und dem iDILI-assoziierten Medikament TVX einen Leberschaden hervor. Im Gegensatz dazu ist im XIM-Modell für DILI (siehe Kap.4.1) die Infektion der Leber mit einem hepatotropen Virus (Adenovirus oder LCMV) notwendig um XIM-DILI auszulösen. Möglicherweise kommt es hierbei durch Virusinfektion zu einer Veränderung der Leber-Homöostase, die in Kombination mit der durch Virusinfektion hervorgerufenen Freisetzung endogener Entzündungsmediatoren wie TNF und durch XIM zur Entwicklung von DILI führt. Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob durch das zusätzlich Vorhandensein einer Virusinfektion auch in LPS/XIM Mäusen Hepatotoxizität hervorgerufen werden kann. Des Weiteren könnte der Leberschaden in Virus-infizierten XIM-Mäusen möglicherweise zu einem definierten Zeitpunkt durch Applikation von TNF induziert werden. Daher wurden in folgenden Versuchen der Einfluss von XIM auf die TNF-induzierte virale Hepatitis untersucht.

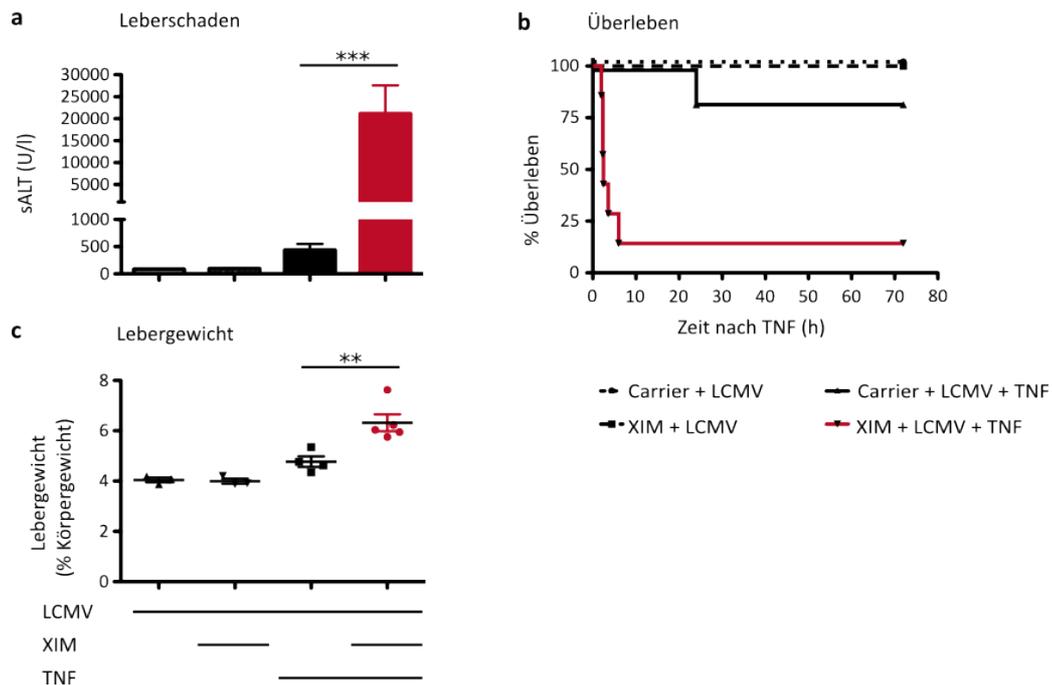
#### **4.5 XIM führt im Modell der TNF-induzierten viralen Hepatitis zu verstärktem Leberschaden und Mortalität der Mäuse**

In der Leber löst die Kreuzpräsentation viraler Antigene auf sinusoidalen Endothelzellen (engl.: *liver sinusoidal endothelial cells*, LSEC) auch in Abwesenheit einer direkten Antigenpräsentation infizierter Hepatozyten, eine zytotoxische T Zell-vermittelte virale Hepatitis aus. CTL produzieren, stimuliert durch kreuzpräsentierende LSEC, das Zytokin TNF, welches die Apoptose von infizierten Hepatozyten induziert. Die Sensitivität gegenüber TNF ist ausschließlich in Virus-infizierten Hepatozyten vorhanden, die Apoptose läuft über eine gesteigerte Caspase-Aktivierung ab. Dieser nicht-kanonischen Effektormechanismus der T Zell-vermittelten Toxizität wurde *in vivo* untersucht indem TNF in Mäuse injiziert wurde die zuvor mit einem hepatotropen Virus infiziert wurden. (Dissertation K. Gärtner, 2011; (Schölzel et al., 2014). Da die durch XIM verstärkte virale Hepatitis TNF-

Rezeptor abhängig ist (siehe Kap. 4.3), wurde das Modell der TNF-induzierten viralen Hepatitis genutzt um den Mechanismus der Leberschädigung durch XIM bei Virusinfektionen aufzudecken. In diesem genau kontrollierbaren Modell lässt sich durch Injektion von TNF die Leberschädigung zu einem definierten Zeitpunkt induzieren und die zugrunde liegenden Apoptosemechanismen der Hepatozyten dadurch genau bestimmen.

Da XIM sowohl bei LCMV- als auch bei Adenovirus-infizierten Mäusen zu einem erhöhten Leberschaden und Letalität führte, wurden diese beiden Viren auch im Modell der TNF-induzierten viralen Hepatitis untersucht. Wt-Mäuse wurden, anders als im zuvor verwendeten Modell, 5 Tage vor und 2 Tage nach Virusinfektion mit XIM behandelt. Des Weiteren wurde nicht die endogene Freisetzung von TNF durch Immunzellen abgewartet, sondern an Tag 2 nach LCMV-Infektionen TNF injiziert und Leberschaden, Überleben der Mäuse und das Lebergewicht determiniert (**Abb. 7**).

Die ALT im Blut lag bei den XIM/LCMV-Mäusen weit über der von Carrier/LCMV-Kontrollen (**Abb. 7a**). Im Einklang mit der erhöhten Leberschädigung steht die Beobachtung, dass die Mortalität nach TNF-Gabe in XIM/LCMV-Tieren bei 80 % lag (**Abb. 7b**). Das prozentuale Lebergewicht bezogen auf das Gewicht der Mäuse war in LCMV-infizierten XIM-Mäusen ebenfalls signifikant erhöht (**Abb. 7c**).



**Abb. 7: XIM induziert im Modell für virale Hepatitis mit LCMV verstärkten Leberschaden und Mortalität.**

Männliche Wt-Mäuse wurde täglich für 7 d XIM (1 mg/Maus/d) oder Carrier p.o. verabreicht. An d 5 wurden die Mäuse mit  $1 \times 10^5$  PFU LCMV i.v. infiziert und an d 7, 1 h 50 min nach XIM-Administration, 400 ng TNF i.v. gespritzt. Die ALT wurde 0 h und 2 h nach TNF bestimmt und das Überleben der Mäuse determiniert. In (a) ist die im Blut detektierte ALT 2 h nach TNF dargestellt. (b) zeigt das Überleben der Mäuse über die Zeit im Kaplan-Meier Plot. Das Lebergewicht in % vom Körpergewicht ist in (c) dargestellt. Die abgebildeten Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente mit 4-7 Mäusen pro Gruppe. Für die Berechnung der Signifikanz wurde der zweiseitige Student's t-Test verwendet (\*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Die Ergebnisse zeigen, dass XIM auch im Modell der TNF-induzierten LCMV-Hepatitis eine erhöhte Leberschädigung hervorruft und zur Letalität eines Großteils der Mäuse führt. Dies bestätigt die zentrale Rolle von TNF in der XIM-induzierten Hepatotoxizität.

Ob XIM ebenfalls bei einer Infektion mit Adenovirus eine verstärkte Schädigung der Leber hervorruft wurde nachfolgend ermittelt.

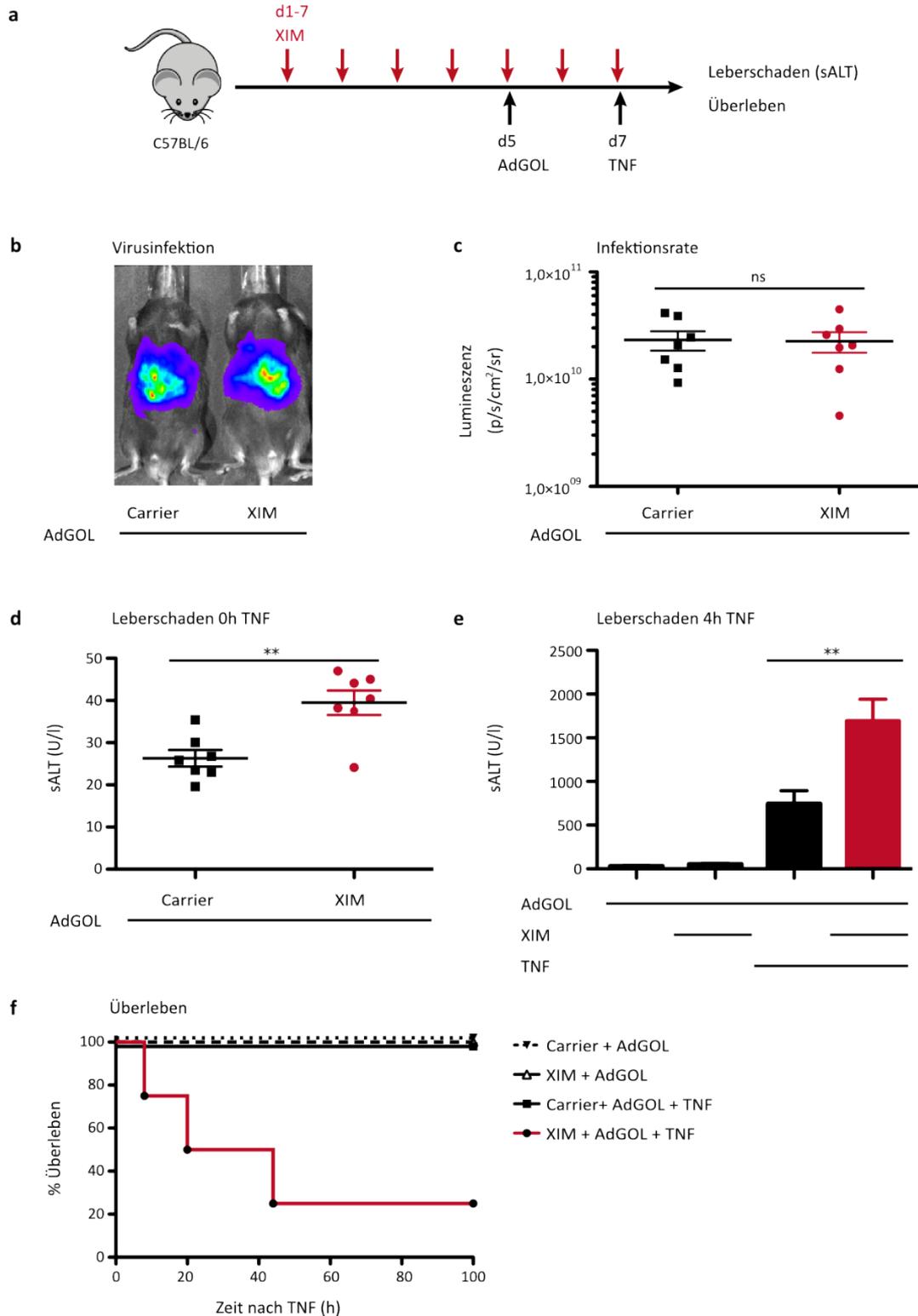
Wt-Mäusen wurde XIM für 7 Tage per Schlundsonde verabreicht. An Tag 5 wurden die Mäuse mit AdGOL infiziert und an Tag 7 die virale Hepatitis durch TNF-Injektion ausgelöst. Der Leberschaden und die Überlebensrate wurden bestimmt (Abb. 8a).

Die Infektionseffizienz nach Adenovirusinfektion wurde im IVIS gemessen (**Abb. 8b/c**). Dabei steht das Maß der Luziferinumsetzung in linearem Zusammenhang zur Viruslast in der Leber (Stabenow et al., 2010). Die detektierte Lumineszenz der vom Virus exprimierten Luziferase war in XIM- und Carrier Mäusen gleich stark (**Abb 8b/c**). Die Gabe von XIM vor Injektion mit dem Virus hatte folglich keinen Einfluss auf die AdGOL-Infektionsrate.

Die Leberschädigung war zum Zeitpunkt der TNF-Applikation in XIM/AdGOL kobehandelten Mäusen etwas stärker als in Tieren, die mit Carrier behandelt wurden (**Abb. 8d**). Nach TNF-Gabe zeigte sich eine deutlich verstärkte Leberschädigung in XIM/AdGOL-Mäusen verglichen mit Kontrolltieren (**Abb. 8e**). Des Weiteren betrug die Sterblichkeit der XIM-behandelten und AdGOL infizierten Mäuse 75 %, von den Kontrollen verstarben keine Tiere (**Abb. 8f**). Die Mortalität variierte zwischen den Versuchen zwischen 25 % und 75 %, wobei sie zumeist 75 % betrug.

Die Ergebnisse zeigen, dass XIM den Leberschaden im Modell der TNF-induzierten viralen Hepatitis deutlich verstärkt und bei einem Großteil der Mäuse zum Tod führt. Die verstärkte Hepatotoxizität und Mortalität sind dabei, wie auch im XIM-DILI Modell ohne TNF-Gabe, unabhängig vom verwendeten Virustyp: Sowohl das RNA-Virus LCMV als auch das DNA-Virus AdGOL riefen in XIM-Mäusen eine vergleichbare Steigerung des parenchymalen Leberschadens und der Mortalität hervor.

Das Zytokin TNF ist in beiden Modellen der XIM-induzierten Leberschädigung (mit endogenem oder verabreichtem TNF) entscheidend für die Entstehung der viralen Hepatitis. In TNF-R1/2<sup>-/-</sup> Mäusen kommt es nicht zur Ausbildung des XIM-induzierten Leberschadens, und nach TNF-Gabe ist die Hepatotoxizität im TNF-induzierten viralen Hepatitis-Modell bei XIM-Mäusen wesentlich stärker.



**Abb. 8: XIM induziert im Modell für virale Hepatitis mit Adenovirus verstärkten Leberschaden und Letalität**

In **(a)** ist das experimentelle Setup dargestellt. Männliche C57BL/6 Mäuse wurde täglich für 7 d XIM (1mg/Maus/d) oder Carrier p.o. verabreicht. An d 5 wurden die Mäuse mit  $5 \times 10^8$  PFU AdGOL i.v. infiziert und an d 7, 1 h 50 min nach XIM-Administration, wurden 400 ng TNF i.v. gespritzt. Die ALT wurde 0 h und 4 h nach TNF bestimmt und das Überleben der Mäuse determiniert. An d 1 nach Infektion wurde die Virusinfektion im IVIS-System untersucht. In **(b)** sind repräsentative Bilder der Biolumineszenz gezeigt; in **(c)** ist die detektierte Lumineszenz der XIM oder Carrier behandelten und AdGOL infizierten Mäuse dargestellt. Die ALT im Blut wurde 0 h nach TNF **(d)** und 4 h nach TNF **(e)** gemessen. In **(f)** ist das Überleben der Mäuse über die Zeit im Kaplan-Meier Plot dargestellt. Die abgebildeten Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente mit 4-7 Mäusen pro Gruppe. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test (\*\*  $p \leq 0,01$ ).

Injiziertes TNF wirkt im Modell der TNF-induzierten viralen Hepatitis direkt auf den TNF-Rezeptor der Hepatozyten. Durch die erhöhte Sensitivität infizierter Hepatozyten in Richtung Apoptose kommt es zum vermehrten Zelltod infizierter Hepatozyten (Dissertation K. Gärtner, 2011; Wohlleber et al., 2012b). Daher deuten die Ergebnisse darauf hin, dass XIM direkt toxisch auf Hepatozyten wirkt, da keine weiteren Immunzellen in diesem Modell der viralen Hepatitis benötigt werden um die Apoptose in Hepatozyten zu initiieren. Die XIM-vermittelte Leberschädigung lässt sich im Modell der TNF-induzierten Hepatitis sehr gezielt untersuchen, da der Mechanismus der Zellschädigung zu definierten Zeitpunkten nach TNF-Gabe untersucht werden kann. Daher wird in folgenden Experimenten bevorzugt dieses Modell zur Untersuchung des XIM-vermittelten Leberschadens herangezogen.

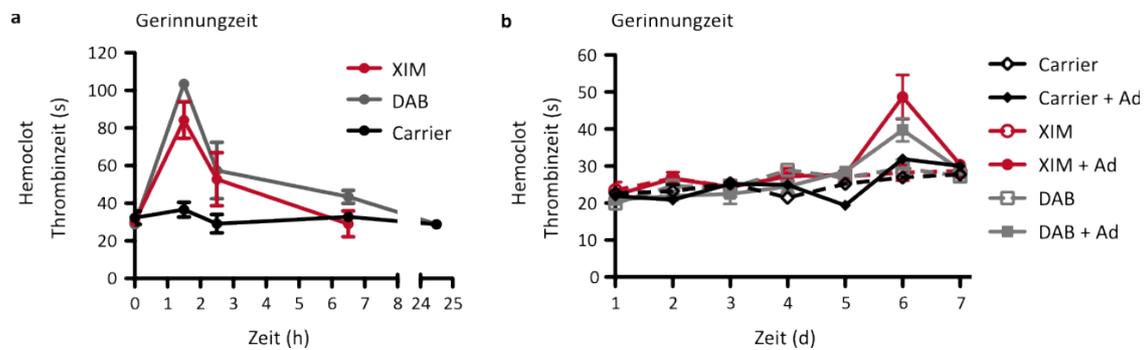
Um herauszufinden, ob die Hemmung des Gerinnungssystems im Zusammenhang mit der Toxizität von XIM steht, wurden in folgenden Versuchen verschiedene Thrombin-Inhibitoren als Kontrollen verwendet.

#### **4.6 XIM-DILI ist unabhängig von der Thrombin-Inhibitoren durch XIM**

Um zu untersuchen, ob der erhöhte Leberschaden durch die antikoagulative Wirkung von XIM zustande kommt, wurden Versuche mit Dabigatranetexilat (DAB) als Kontrolle durchgeführt. Wie auch bei XIM handelt es sich bei DAB um einen reversiblen direkten Thrombin-Inhibitor, der oral verabreicht wird. Das Medikament ist seit 2008 auf dem deutschen Markt zugelassen und bisher wurde – anders als bei XIM – keine erhöhte Inzidenz von Medikamenten-induzierten Leberschaden festgestellt (Caldeira et al., 2014).

Um eine mit XIM vergleichbare gerinnungshemmende Wirkung der Kontrollsubstanz DAB sicherzustellen, wurde ein Vorversuch durchgeführt. Die verabreichte Dosis von DAB ist im Menschen etwa viermal so hoch wie die von XIM (150 mg b.i.d. DAB bzw. 36 mg b.i.d. XIM) (Schulman et al., 2009) (Olsson and Executive Steering Committee of the SPORTIF III Investigators, 2003). Daher wurde die DAB-Dosis in Mäusen entsprechend angepasst. Wt-Mäusen wurde entweder XIM, DAB oder Carrier per Schlundsonde verabreicht. In kurzen Intervallen nach Medikamenten-Gabe wurde Blut aus der Schwanzvene entnom-

men, Plasma gewonnen und die Hemoclot Thrombinzeit bestimmt. Die gemessene Zeit bis zur Bildung eines Fibringerinnsels im Kugelkoagulometer ist proportional zur Plasmakonzentration der Thrombin-Inhibitoren in der Probe (van Ryn et al., 2010). Die Analyse zeigte, dass XIM und DAB in den verabreichten Dosen (3 mg DAB/Maus; 1 mg XIM/Maus) das Koagulationssystem etwa gleich stark inhibierten, da keine signifikanten Unterschiede in der Haemoclot Thrombinzeit festgestellt wurden (**Abb. 9a**). Da die gerinnungshemmende Wirkung von DAB leicht über der von XIM lag eignet sich die verabreichte DAB-Dosis als Kontrolle für nachfolgende Versuche, da somit ein Einfluss der Koagulationshemmung auf den Leberschaden ausgeschlossen werden kann.



**Abb. 9: Analyse der Gerinnungszeit nach Verabreichung von XIM, DAB oder Carrier.**

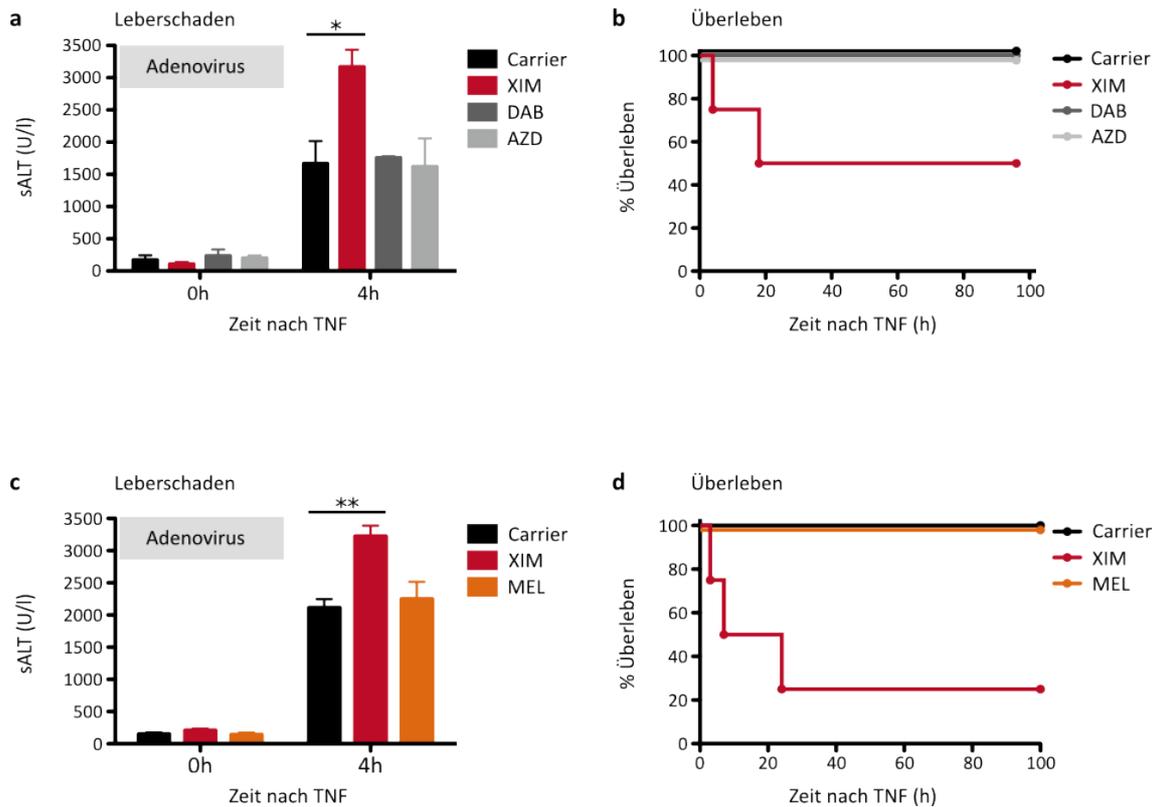
In **(a)** ist die Hemoclot Thrombinzeit über die Zeit nach Gabe von XIM, DAB oder Carrier dargestellt. Wt-Mäusen wurde mit 1 mg XIM/Maus, 3 mg DAB/Maus oder Carrier p.o. behandelt. 0 h, 1,5 h, 2,5 h, 6,5 h und 25 h nach Medikamenten-Gabe wurde mit einer Spritze Blut aus der Schwanzvene entnommen, mit Citratpuffer versetzt und das Plasma durch Zentrifugation gewonnen. Die Gerinnungszeit wurde am Kugelkoagulator bestimmt. **(b)** Zeigt die Hemoclot Thrombinzeit nach Administration von XIM, DAB oder Carrier über den Zeitraum einer Woche. Wt-Mäuse wurden für 7 d täglich mit XIM (1 mg/Maus), DAB (3 mg/Maus) oder Carrier p.o. behandelt. An d 5 wurden die Mäuse mit  $5 \times 10^8$  PFU AdGOL i.v. infiziert. Die Gerinnungszeit wurde täglich 23 h nach der letzten Administration von XIM, DAB oder Carrier bestimmt. Die Analyse der Hemoclot Thrombinzeit wurde von Marco Dorn, Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Bonn, vorgenommen. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei **(b)** bzw. drei **(a)** unabhängige Experimente mit 3 Mäusen pro Gruppe. Für die Berechnung der Signifikanz wurde der zweiseitige Student's t-Test verwendet (\*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ).

Des Weiteren wurde untersucht, ob es bei mehrtägiger Administration der Gerinnungsinhibitoren zur Akkumulation der aktiven Bestandteile Melagatran (MEL) oder Dabigatran im Blut, resultierend in erhöhter Thrombinzeit, kommt. Dazu wurden die Produks XIM und DAB oder der Carrier über 7 Tage verabreicht und ein Teil der Mäuse an Tag 5 mit Adenovirus infiziert. Es zeigte sich keine gesteigerte Inhibition der Gerinnung durch

mehrtägige Administration von XIM oder DAB (**Abb. 9b**). Dies bedeutet, dass es nicht zur Akkumulation der aktiven Bestandteile der Thrombin-Inhibitoren im Blut kommt. In Ad-GOL infizierten Mäusen war einen Tag nach Infektionen eine leichte Erhöhung der Thrombinzeit vorhanden.

Adenovirus Typ 5 schützt sich durch Bindung von Faktor X (FX) des Gerinnungssystems vor Antikörper- und Komplement-vermittelter Elimination und nur durch FX-Bindung ist das Virus zur Transduktion in Hepatozyten fähig (Nemerow, 2013; Xu et al., 2013a). Neben FX bindet das Virus auch die Gerinnungsfaktoren Faktor VII (FVII) und Faktor IX (FIX) (Irons et al., 2013). Möglicherweise kommt es durch Bindung der Gerinnungsfaktoren an das Virus zu einem reduzierten Serumlevel und damit einhergehend zu Veränderungen in der Gerinnungszeit kurz nach Infektion.

Nach der Dosisfindung von DAB wurde die Wirkung des Kontroll-Thrombininhibitors auf die TNF-induzierte viralen Hepatitis ermittelt. Weiterhin wurde die Nachfolgesubstanz von XIM, AZD0837 (AZD), auf ihren Einfluss auf die TNF-induzierte virale Hepatitis untersucht. AZD ist ein Pro-Drug des kompetitiven und reversibelen direkten Thrombin-Inhibitor AR-H0637 (Johansson et al., 2011; Lip et al., 2011). Dieser bindet wie XIM an freies und Fibrin-gebundenes Thrombin. Die Entwicklung von AZD wurde 2010 gestoppt, da das Medikament eine begrenzte Langzeitstabilität aufweist und verglichen mit Warfarin zu einer leicht erhöhten Mortalität führte (Squizzato et al., 2009). Die ALT-Level von Patienten mit AZD- oder Kontroll-Behandlung unterschieden sich nicht signifikant. Anders als bei XIM scheint AZD daher keine hepatotoxischen Eigenschaften aufzuweisen (Lip et al., 2009). Weiterhin wurde Melagatran (MEL), der aktive Wirkstoff von XIM, untersucht. Dazu wurde Mäusen für 7 konsekutive Tage einer der Thrombin-Inhibitoren oder Carrier per Schlundsonde verabreicht und an Tag 5 fand die Infektion mit Adenovirus statt. An Tag 7 wurde der Leberschaden nach TNF erfasst und die Mortalität bestimmt.



**Abb. 10: XIM-DILI wird nicht durch Thrombin-Inhibition hervorgerufen.**

Männlichen Wildtyp-Mäusen wurde für 7 d XIM (1 mg/Maus/d), DAB (3 mg/Maus/d), AZD (3,16 mg/Maus/d), MEL (1,5 mg/Maus/d) oder Carrier p.o. verabreicht. An d 5 fand die i.v. Infektion der Mäuse mit  $5 \times 10^8$  PFU AdGOL statt. An d 7, 1 h 50 min nach Medikamenten- oder Carrier-Administration, wurden 400 ng TNF i.v. gespritzt und die ALT im Blut 0 h und 4 h nach TNF-Gabe bestimmt. **(a)** Stellt die ALT 4 h nach TNF Applikation, **(b)** das Überleben über die Zeit im Kaplan-Meier Plot eines repräsentativen Versuches dar. Melagatran (MEL), der aktive Wirkstoff von XIM, wurde in **(c)** und **(d)** mit XIM verglichen. In **(c)** ist die ALT 4 h nach TNF Injektion, und in **(d)** das Überleben im Kaplan-Meier Graph eines Versuches gezeigt. Die abgebildeten Ergebnisse sind repräsentativ für drei **(a/b)** bzw. zwei **(c/d)** unabhängige Experimente mit 4 Mäusen pro Gruppe. Die statistische Analyse erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ )

Die ALT war in Adenovirus-infizierten Mäusen nur nach XIM erhöht (**Abb. 10a**). Weder DAB noch AZD führten zu einem erhöhtem Leberschaden nach TNF. Auch auf die Mortalität hatten die Thrombin-Inhibitoren DAB oder AZD keinen Einfluss (**Abb. 10b**). Das Verabreichen von MEL, dem aktiven Wirkstoff von XIM, hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die TNF-induzierte virale Hepatitis (**Abb. 10c/d**). Es wurden nicht wie bei XIM-Gabe erhöhte ALT-Werte detektiert, noch war das Überleben der Mäuse verringert.

Da nur XIM, und nicht die anderen Thrombin-Inhibitoren DAB, AZD, MEL zu einer verstärkten Leberschädigung und Mortalität bei der TNF-induzierten viralen Hepatitis führen, kann ausgeschlossen werden, dass der durch XIM-verstärkte Leberschaden und die Letalität durch Thrombin-Inhibition hervorgerufen werden. Es handelt sich beim XIM-induzierten Leberschaden folglich um einen spezifischen Effekt und nicht um ein Resultat der Gerinnunshemmung.

## **4.7 Abhängigkeit von XIM-DILI von Viruslast und Expositionsdauer**

Zur weiteren Charakterisierung der XIM-DILI im Modell der TNF-induzierten viralen Hepatitis wurde untersucht, ob Viruslast oder Expositionsdauer mit XIM Einfluss auf den Leberschaden oder das Überleben der Mäuse haben.

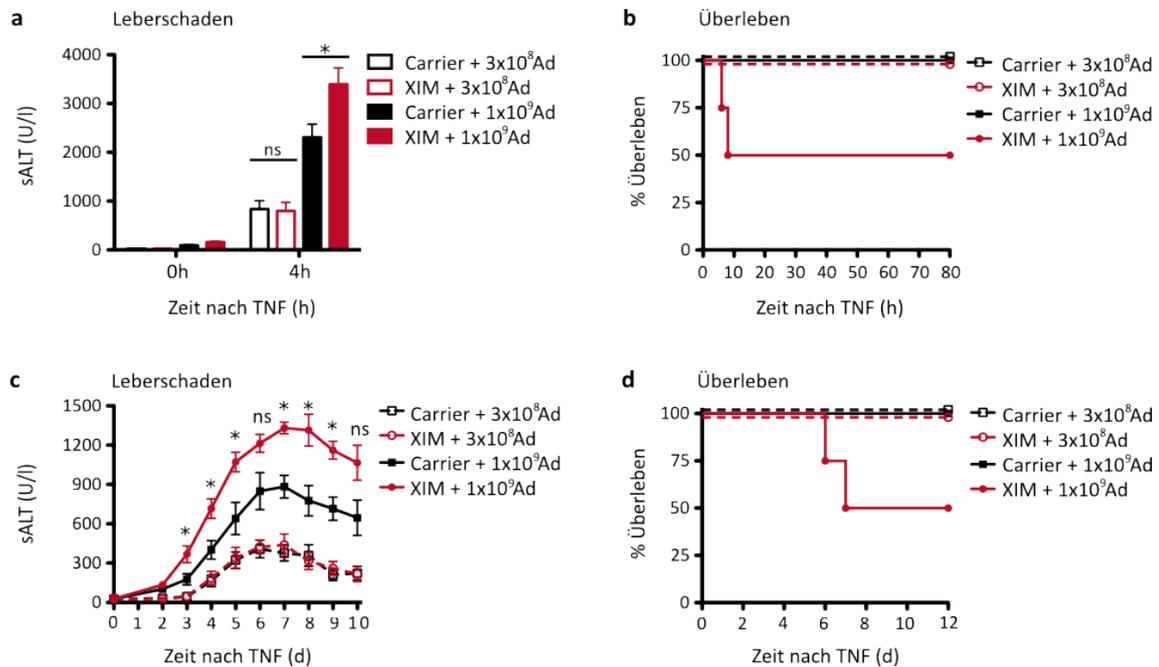
### **4.7.1 Ausschließlich hohe Viruslast induziert XIM-vermittelten Leberschaden und Mortalität**

Als nächstes wurde ermittelt, ob die Stärke der Virusinfektion einen Einfluss auf den durch XIM induzierten Leberschaden hat. Da es sich bei LCMV um ein reproduktionsfähiges Wildtyp-Virus handelt, konnte das Virus für die Untersuchung des Einflusses der Viruslast nicht verwendet werden. Hingegen ist das verwendete Adenovirus durch Deletion der Gene E1 und E3 *in vivo* nicht zur Replikation fähig (Stabenow et al., 2010). Daher konnte die Bedeutung der Viruslast in beiden Modellen (siehe Abb. 2) für XIM-DILI untersucht werden.

Die Mäuse wurden für 7 konsekutive Tage mit XIM oder Carrier gefüttert und an Tag 5 mit entweder  $3 \times 10^8$  PFU oder  $1 \times 10^9$  PFU AdGOL infiziert. An Tag 7 wurden die ALT-Werte im Blut 4 h nach TNF gemessen. Nur in XIM-Mäusen, die mit einer hohen Adenovirus-Dosis infiziert wurden, war ein verstärkter parenchymaler Leberschaden vorhanden (**Abb. 11a**). Im Einklang zu diesen Beobachtungen stehen die Ergebnisse der Überlebensrate. Nur in XIM-Mäusen, die mit einer hohen Virus-Dosis infiziert wurden, war eine erhöhte Sterblichkeit vorhanden (**Abb. 11b**).

Im zweiten Modell für XIM-vermittelten Leberschaden (ohne Verabreichung von TNF), wenn die Mäuse zuerst infiziert und anschließend mit XIM behandelt werden (siehe Abb. 2a) zeigte sich ebenfalls die Abhängigkeit der XIM-vermittelten Hepatotoxizität von der

Viruslast. Ausschließlich die hohe Infektionsrate führte zur gesteigerten Hepatotoxizität (**Abb. 11c**) und zur vermehrten Mortalität (**Abb. 11d**) der XIM-Mäuse.



**Abb. 11: Ausschließlich hohe Viruslast induziert XIM-DILI.**

(a/b) Männliche Wt-Mäuse wurden für 7 Tage mit XIM (1 mg/Maus/d) oder Carrier p.o. behandelt. An d 5 fand die intravenöse Infektionen der Mäuse mit entweder 3x10<sup>8</sup> PFU oder 1x10<sup>9</sup> PFU AdGOL statt. An d 7, 1 h 50 min nach XIM- oder Carrier-Administration, wurden 400 ng TNF i.v. gespritzt und die ALT im Blut nach TNF-Gabe, sowie die Überlebensrate bestimmt. In (a) ist die ALT 0 h und 4 h nach TNF Applikation dargestellt. (b) Zeigt das Überleben der Mäuse im Kaplan-Meier Plot über die Zeit. In (c/d) wurden Wt-Mäuse entweder mit 3x10<sup>8</sup> PFU oder 1x10<sup>9</sup> PFU AdGOL i.v. infiziert und ab d 1 wurde täglich XIM (1 mg/Maus/d) p.o. verabreicht. Die Entwicklung der ALT im Blut über die Zeit ist in (c) abgebildet. (d) Stellt das Überleben der Mäuse im Kaplan-Meier Graph über die Zeit dar. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit 4 Mäusen pro Gruppe. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test (\* p ≤ 0,05).

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass XIM nur in Mäusen, die mit einer hohen Virus-Dosis infiziert wurden, einen erhöhten Leberschaden und Mortalität hervorruft. Dabei ist das Ergebnis unabhängig vom gewählten XIM-DILI-Modell. Sowohl im Modell für XIM-induzierten viralen Leberschaden als auch im Modell für XIM/TNF-induzierten viralen Leberschaden hängt die Hepatotoxizität von XIM von der Viruslast der Hepatozyten ab. Es scheint notwendig zu sein, dass eine gewisse Anzahl von Hepatozyten infiziert ist, oder manche Hepatozyten mit besonders vielen Viren, damit XIM hepatotoxisch wirkt. Bisher finden sich in der Literatur zwar Daten aus klinischen Studien, die Virusinfektionen mit DILI in Verbindung bringen (Bonacini, 2004; den Brinker et al., 2000; Kim et al., 2016;

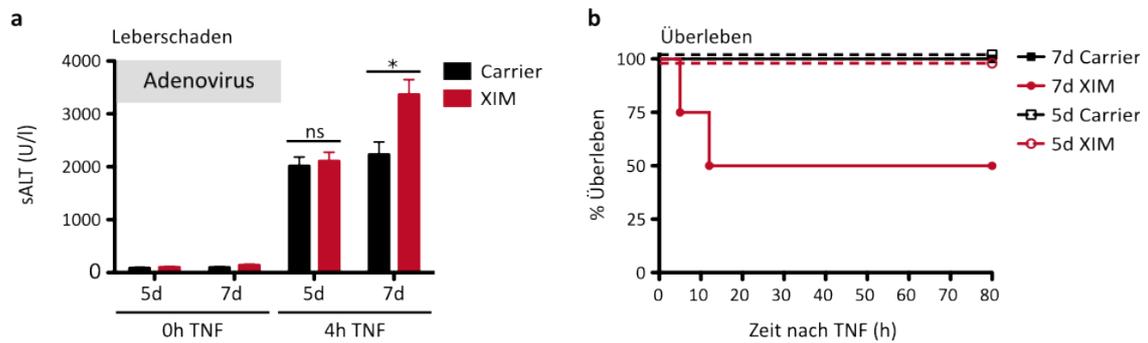
Ungo et al., 1998; Wong et al., 2000), es ist allerdings nicht bekannt, ob diese Infektion eine gewisse Stärke übersteigen müssen, um die hepatotoxische Wirkung eines Medikamentes hervorzurufen.

#### **4.7.2 Ausschließlich längere XIM-Administration induziert erhöhten Leberschaden und Mortalität**

Im nächsten Schritt sollte die XIM-DILI näher charakterisiert werden. In klinischen Studien zeigte sich die hepatotoxische Wirkung von XIM beim Menschen erst nach einer längeren Verabreichungsdauer (Lee et al., 2005). Daher wurde getestet, ob auch im Mausmodell eine längere Exposition mit XIM notwendig ist, um die Leberschädigung zu induzieren.

Dazu wurde XIM für 5 oder wie bisher 7 konsekutive Tage peroral verabreicht. An Tag 3 bzw. 5 wurden die Mäuse mit Adenovirus infiziert und 2 Tage später der Leberschaden und das Überleben nach TNF bestimmt. Dabei zeigte sich, dass es bei einer XIM-Administration von 5 Tagen nicht zu einem verstärktem Leberschaden im TNF-induzierten Hepatistmodell kommt (**Abb. 12a**). Auch zeigte sich keine verstärkte Mortalität der XIM-Mäuse wie nach 7 tägiger Verabreichung beobachtet (**Abb 12b**).

Nur die längere Administration von XIM über eine Woche, und nicht die 2 Tage kürzere Gabe führte zu einem verstärktem Leberschaden und zur Mortalität im TNF-induzierten Hepatistmodell. Dieses Ergebnis deckt sich mit den im Menschen gemachten Beobachtungen, dass die XIM-vermittelte Hepatotoxizität erst mit einer Latenz von über einem Monat auftritt (Lee et al., 2005). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die toxische Wirkung von XIM erst in den Hepatozyten, wo es metabolisiert wird, akkumulieren muss, um eine Schädigung zu induzieren.



**Abb. 12: Ausschließlich längere XIM-Administration induziert erhöhten Leberschaden und Letalität.** Wt-Mäusen wurde für 5 oder 7 Tage XIM (1 mg/Maus/d) oder Carrier p.o. verabreicht. An d 3 bzw. d 5 fand die intravenöse Infektionen der Mäuse mit  $5 \times 10^8$  PFU AdGOL statt. An d 5 bzw. d 7, 1 h 50 min nach XIM- oder Carrier-Administration, wurden 400 ng TNF i.v. gespritzt und die ALT im Blut 0 h und 4 h nach TNF, sowie die Überlebensrate bestimmt. In **(a)** ist die ALT 0 h und 4 h nach TNF Applikation dargestellt. **(b)** Zeigt das Überleben der Mäuse im Kaplan-Meier Plot über die Zeit. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit 4 Mäusen pro Gruppe. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des zweiseitigen Student's t-Test errechnet (\*  $p \leq 0,05$ ).

Da Hepatozyten besonders anfällig gegenüber Schädigungen durch Medikamente sind und diese Zellen bei der TNF-induzierten viralen Hepatitis zentraler Angriffspunkt von TNF sind, wodurch der Tod infizierter Hepatozyten eingeleitet wird, wurde die Apoptose im XIM-DILI-Modell genauer untersucht.

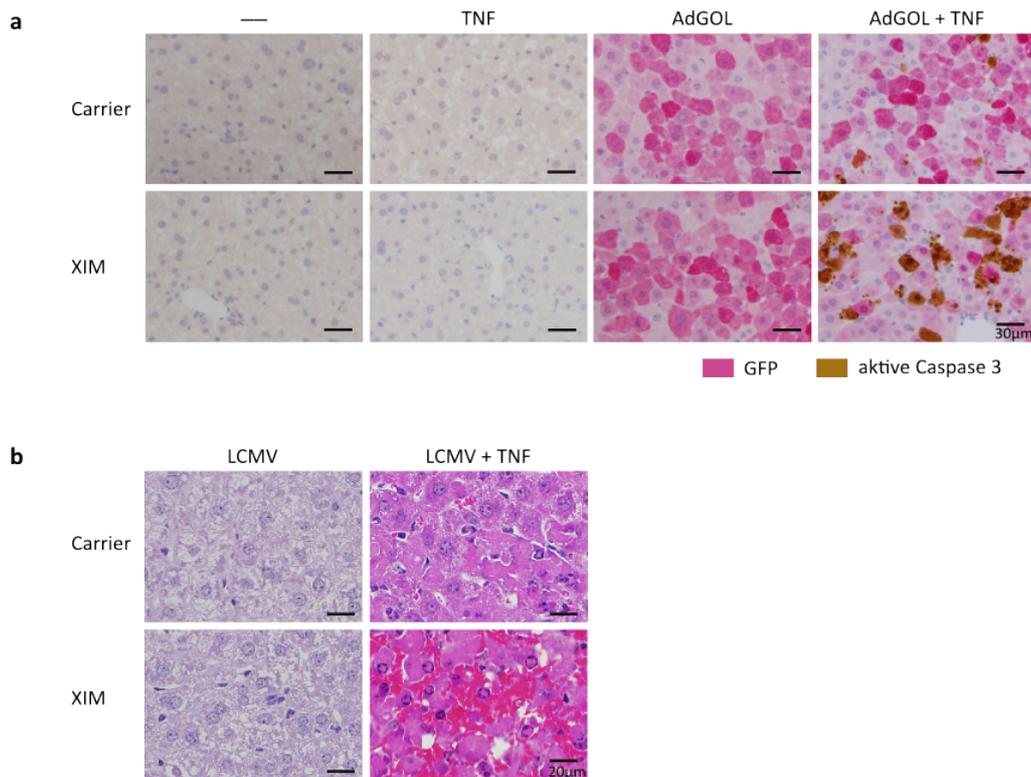
## 4.8 XIM verstärkt Apoptose von Leberzellen in Virus-infizierten Mäusen

Apoptose kann über den extrinsischen oder intrinsischen Signalweg ausgelöst werden. Der extrinsische Signalweg wird über Todesrezeptoren vermittelt, beim intrinsischen Signalweg sind Mitochondrien das zentrale Element. In Hepatozyten wird für eine effiziente Apoptose durch den extrinsischen Signalweg eine Amplifikation der Caspase Aktivierung über Mitochondrien benötigt (Ding and Yin, 2004). Der extrinsische Signalweg wird beispielsweise durch die Bindung von TNF an TNF-R1 eingeleitet. In der Leber sind Hepatozyten das primäre Ziel von TNF bei hepatotroper Virusinfektion von Mäusen. Ausschließlich infizierte Hepatozyten sind gegenüber TNF sensitiviert, wodurch die TNF-Signaltransduktion nur in diesen Zellen zur Induktion der Apoptose führt (Dissertation

K. Gärtner 2011; Wohlleber et al., 2012). Nach Stimulation mit seinem Ligand trimerisiert der TNF-R1 und rekrutiert verschiedene Adaptorproteine, die die Aktivierung der Initiator-Caspase 8 initiieren. Aktive Caspase 8 spaltet Bid, wodurch t-Bid (engl.: *truncated Bid*) generiert wird. T-Bid transloziert zu Mitochondrien und zusammen mit aktivem Bax und Bak kommt es zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, wodurch proapoptotische Faktoren wie Cytochrom c aus dem Intramembranraum freigesetzt werden. Dadurch wird das Apoptosom, ein Proteinkomplex aus Caspase 9 und APAF-1 gebildet. Das Apoptosom induziert Caspase 9 Aktivierung wodurch wiederum die Effektor Caspasen 3,7, und 6 aktiviert werden und es zur Apoptose der Hepatozyten kommt (MALHI et al., 2010).

Da XIM/Virus-Mäuse nach TNF einen höheren Leberschaden und hohe Mortalitätsraten aufweisen (siehe Kap. 4.5) wurde untersucht, ob der verstärkte Leberschaden auf eine erhöhte Caspase-Aktivierung – und somit eine verstärkte Apoptose – zurückzuführen ist. Dazu wurden Wt-Mäuse für 7 Tage mit XIM behandelt, an Tag 5 mit den hepatotropen Viren AdGOL oder LCMV infiziert und an Tag 7 TNF injiziert (siehe Abb. 2b).

Der Leberschaden von XIM/Virus-Mäusen nach TNF-Gabe wurde histologisch untersucht und mit dem von Kontrolltieren verglichen (**Abb. 13**). Dabei wurden weder bei Behandlung mit XIM, TNF, AdGOL oder bei XIM/TNF- bzw. XIM/AdGOL-Kobehandlung Caspase 3-positive Zellen detektiert (**Abb. 13a**). Die Ergebnisse stehen im Einklang mit publizierten Daten, die zeigen, dass TNF oder AdGOL allein keine Apoptose von Leberzellen induzieren (Wohlleber et al., 2012a). Die Expression des von AdGOL exprimierten GFP (pink dargestellt) zeigte keine Unterschiede zwischen XIM- oder Carrier behandelten virusinfizierten Lebern. XIM hat somit keinen Einfluss auf die Infektionseffizienz des Virus (vgl. auch **Abb. 8a/b**). Allerdings wurde ein deutlicher Unterschied in der Anzahl der Caspase 3-positiven Leberzellen bei XIM/AdGOL-Mäusen beobachtet verglichen mit Carrier-Kontrollen (**Abb 13a**). Die Anzahl der apoptotischen Hepatozyten – gezeigt durch Caspase 3-Aktivierung – wurde durch XIM stark erhöht. XIM induzierte ausschließlich in Hepatozyten, die mit AdGOL infiziert waren nach TNF-Gabe eine verstärkte Apoptose der infizierten Zellen.



**Abb. 13: Verstärkte Leberschädigung und Caspase 3 Aktivierung in XIM-behandelten virus-infizierten Mäusen nach TNF-Gabe.**

Wt-Mäuse wurden für 7 konsekutive Tage mit XIM (1 mg/Maus/d) oder Carrier p.o. behandelt. An d 5 fand die intravenöse Infektionen der Mäuse mit  $10^9$  PFU AdGOL (**a**) oder  $10^5$  PFU LCMV (**b**) statt. An d 7, 1 h 50 min nach XIM- oder Carrier-Administration, wurden 400 ng TNF i.v. gespritzt. Die Lebern wurden 1 h nach TNF mit Perfusion (**a**) oder 2 h nach TNF ohne Perfusion (**b**) entnommen, Leberschnitte angefertigt und HE gefärbt. In (a) wurde zusätzlich eine immunhistochemische Färbung für aktive Caspase 3 vorgenommen. Die Leberschnitte und Färbungen wurden vom Institut für Virologie, Helmholtz Zentrum München angefertigt. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Leberschnitt. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit mindestens 4 Mäusen pro Gruppe.

Bei den LCMV-infizierten Lebern wurden durch die alleinige Verabreichung von XIM ebenfalls keine Apoptose induziert (**Abb. 13b**). Wurde die Leberschädigung LCMV-infizierter Mäuse allerdings nach TNF beobachtet, so zeigte sich, vor allem in XIM-Mäusen, eine stark erhöhte Anzahl von geschädigten Leberzellen und eine *Peliosis Hepatitis*. Mögliche Ursachen für *Peliosis hepatitis* sind verstärkter Zelltod durch Nekrose oder das Sterben von Leberparenchymzellen, wodurch Erythrozyten nicht mehr austreten können und es zum „Versacken“ von Blut in der Leber kommt (Crocetti et al., 2015).

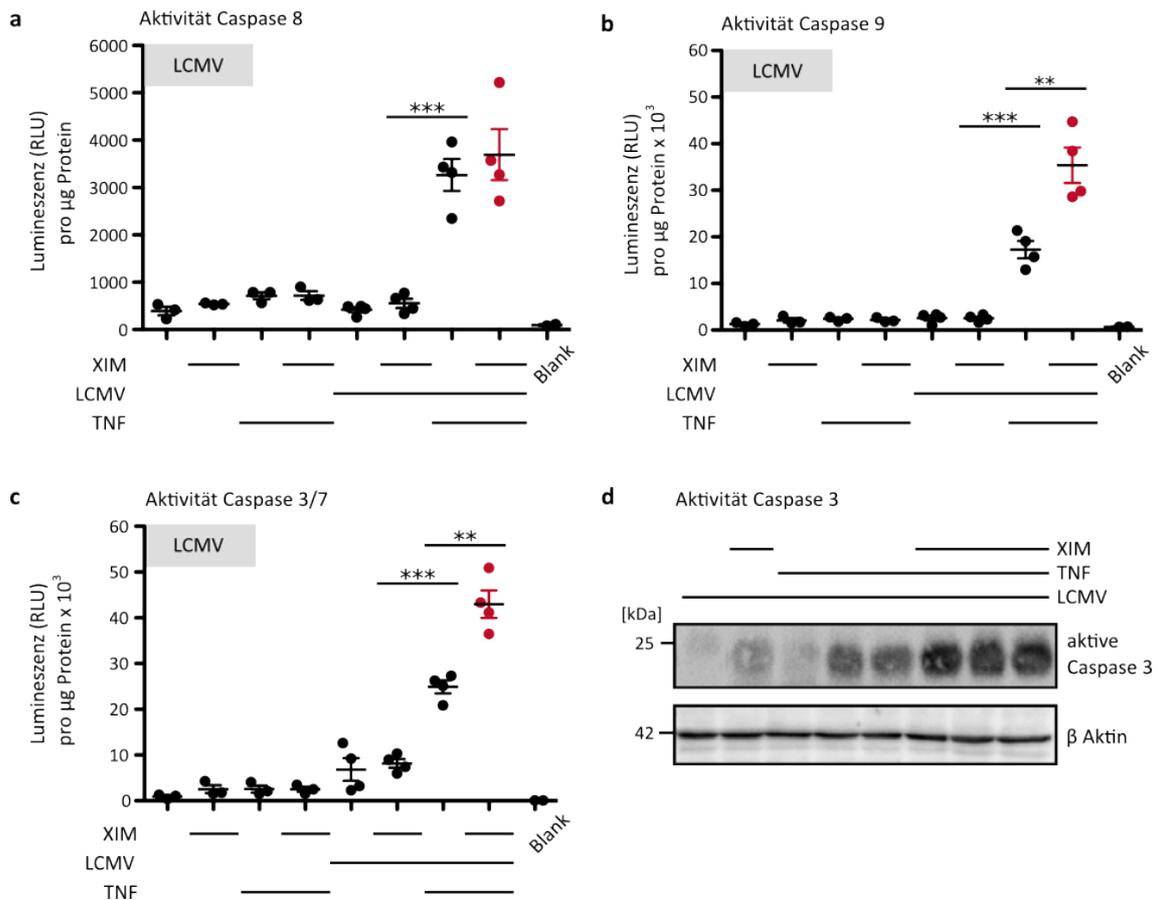
Zusammenfassend bestätigen die histologischen Ergebnisse, dass die Leberschädigung nur in XIM/Virus-Mäusen nach TNF verstärkt ist (vgl. Kap. 4.5). Die erhöhte Caspase 3-Aktivierung in AdGOL infizierten Mäusen, zeigt eine verstärkte Apoptose in XIM/AdGOL Mäusen.

Da es sich beim verwendeten LCMV-Stamm um ein Wildtypvirus handelt, konnte keine GFP-Färbung für infizierte Leberzellen vorgenommen werden. Daher war eine gleichzeitige Anfärbung Virus-infizierter und Caspase 3-positiver Zellen in der durchgeführten Histologie nicht möglich. Der verstärkte Zelltod in XIM/LCMV-Mäusen wurde deshalb durch Ermittlung der Caspase-Aktivität im Caspase Assay (siehe Kap. 3.6) untersucht.

Die Aktivierung der Initiator-Caspase 8 sowie der Effektor-Caspase 9 sowie 3/7 wurde ermittelt (**Abb. 14**).

Dabei zeigte sich in XIM/LCMV/TNF-Mäusen, verglichen mit entsprechenden Carrier-Kontrollen, eine unveränderte Caspase 8 Aktivierung (**Abb. 14a**). Hingegen war die Aktivierung der Effektor-Caspase 9 in XIM-Tieren stark erhöht (**Abb. 14b**). Auch die Aktivierung der ausführenden Caspase 3/7 in Leberzellen wurde durch XIM verstärkt, wie im Immunoblot und Caspase Assay gezeigt (**Abb. 14c/d**).

Die Ergebnisse zeigen, dass XIM in Virus-infizierten Mäusen nach TNF eine verstärkte Aktivierung der Effektor-Caspasen 9 und 3/7 induziert. Unabhängig davon, ob die Mäuse mit dem Doppelstrang-DNA-Virus AdGOL oder dem Einzelstrang-RNA-Virus LVMV infiziert waren, wurde nach TNF in Leberzellen von XIM behandelten Tieren eine verstärkte Apoptose nachgewiesen.



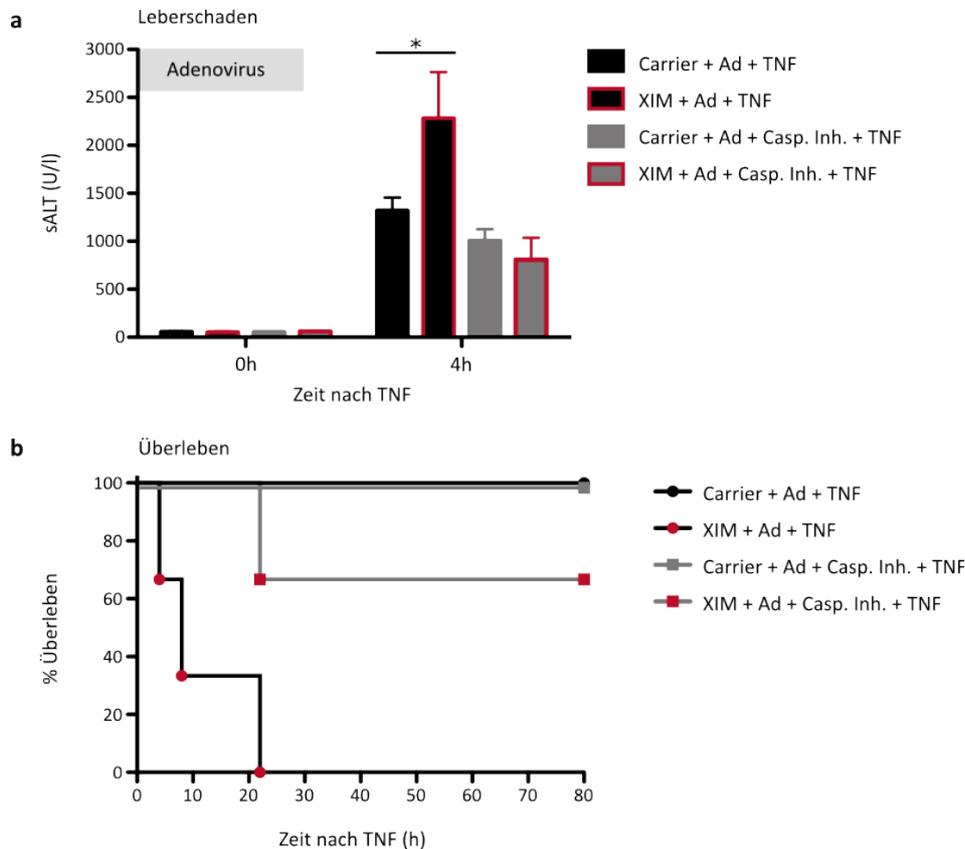
**Abb. 14: Aktivierung von Caspase 8, 9 und 3/7 nach TNF bei XIM-DILI.**

Wt-Mäuse wurden für 7 Tage mit XIM (1 mg/Maus/d) oder Carrier p.o. behandelt. An d 5 wurde die Mäuse mit LCMV i.v. infiziert. An d 7, 1 h 50 min nach XIM- oder Carrier-Administration, wurden 400 ng TNF i.v. gespritzt. Die Lebern wurden 1 h nach TNF-Injektion entnommen und für den Caspase Assay und Western Blot verwendet. Die Aktivität von Caspase 8 **(a)**, Caspase 9 **(b)** und Caspase 3/7 **(c)** wurde mittels Caspase Assay untersucht. **(d)** Zeigt einen Immunoblot für aktive Caspase 3 und  $\beta$  Aktin. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit 4 Mäusen **(a-c)** bzw. 3 Mäusen **(d)** pro Gruppe. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit Hilfe des zweiseitigen Student's t-Test (\*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ).

#### 4.8.1 Inhibition von XIM-DILI durch Blockade der Caspase-Aktivierung

Im Folgenden wurde genauer untersucht, ob Apoptose der entscheidende Todesmechanismus ist, durch den die verstärkte Hepatotoxizität und Mortalität von XIM ausübt wird, oder ob noch andere Mechanismen wie beispielsweise Nekrose eine Rolle spielen. Deshalb wurde ermittelt, ob XIM-Mäuse durch Blockade der Caspase-Aktivierung vor erhöhtem Leberschaden und Mortalität protektiert werden. Durch Verabreichung des pan-

Caspase Inhibitors Q-VD-OPH kurz vor TNF konnte der durch XIM verstärkte Leberschaden auf das Niveau der Kontrollen reduziert werden (**Abb. 15a**). Des Weiteren wurde die Sterblichkeit der XIM/AdGOL/TNF-Mäuse annähernd auf die Rate der entsprechenden Kontrolltiere reduziert (**Abb. 15b**).



**Abb. 15: Protektiver Effekt von Caspase-Inhibition auf XIM-DILI bei Adenovirus Infektion.**

Wt-Mäuse wurde für 7 Tage entweder XIM (1 mg/Maus/d) oder Carrier p.o. verabreicht. An Tag 5 fand die Infektion der Mäuse mit  $5 \times 10^8$  PFU AdGOL i.v. statt. 2 Tage nach Infektion, an d 7 wurde, 80 Min nach letztmaliger XIM- oder Carrier-Administration der pan-Caspase Inhibitor Q-VD-OPH i.p. verabreicht. 110 Min nach der letzten XIM- oder Carrier-Behandlung wurden 400 ng TNF i.v. injiziert. Die ALT-Messung wurde 0 h und 4 h nach TNF durchgeführt. **(a)** Stellt die im Serum gemessenen ALT-Konzentration 0 h und 4 h nach TNF dar. In **(b)** ist das Überleben der Mäuse über die Zeit im Kaplan-Meier Plot abgebildet. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit 3-4 Mäusen pro Gruppe. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test (\*  $p \leq 0,05$ ).

Zusammenfassend zeigte sich, dass die XIM-induzierte Verstärkung des Leberschadens und der Mortalität bei Adenovirus-infizierten Mäusen durch Inhibition von Caspasen blockiert werden kann. Bei XIM-Tieren ist der verstärkte Leberschaden und die Sterblichkeit

somit hauptsächlich auf eine erhöhte Apoptoserate in Leberzellen zurückzuführen zu sein und andere Todesmechanismen, wie beispielsweise Nekrose sind nicht primär involviert. Da Adenovirus selektiv Hepatozyten infiziert (Dissertation K. Gärtner, 2011) betrifft die verstärkte Apoptose vorwiegend diese Zellen.

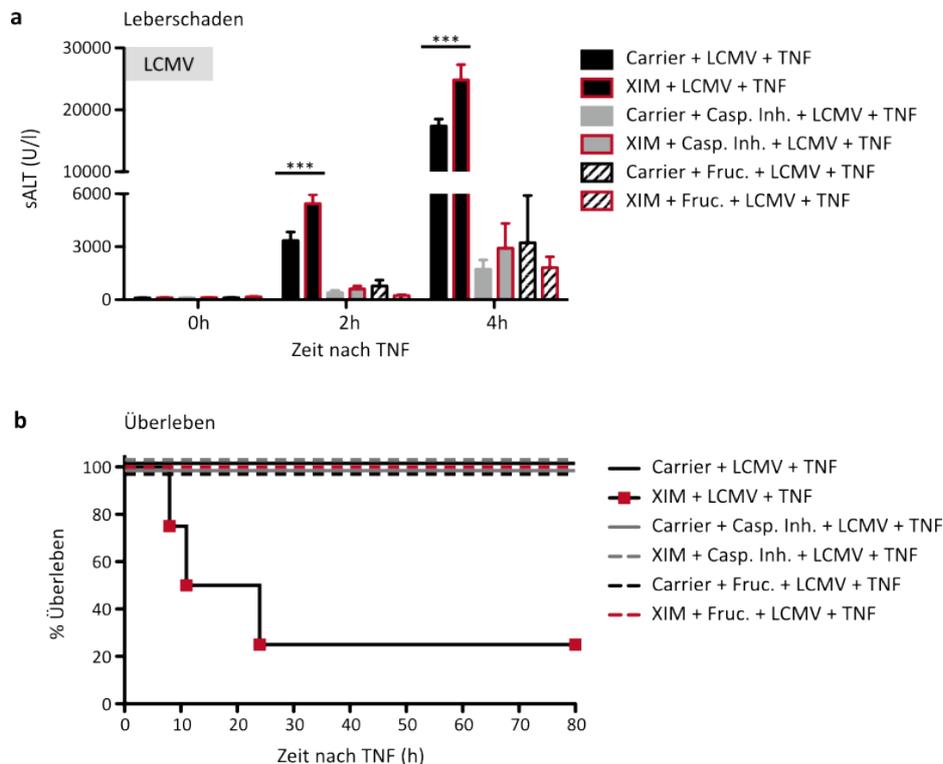
Im Folgenden wurde überprüft, ob auch in LCMV-infizierten Tieren die XIM-verstärkte Apoptose durch Inhibitoren vermindert werden kann. Zur Blockierung der Apoptose wurde zum Einen, wie oben beschrieben, der pan-Caspase Inhibitor Q-VD-OPH genutzt, zum Anderen wurde Fructose verwendet. Da für den Ablauf der Apoptose Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) benötigt, kann der Zelltod in Hepatozyten durch Depletion von ATP inhibiert werden. Durch Verabreichung von hohen Mengen der Ketohehexose Fructose wird in Leberparenchymzellen von Mäusen für über 2 Stunden etwa 80% des zellinternen ATP verbraucht, wodurch letztlich der TNF-induzierte apoptotische Zelltod nicht mehr ablaufen kann (Latta et al., 2000). Auch im Menschen kommt es nach Aufnahme von hohen Mengen an Fructose zur Depletion von hepatischem ATP (Abdelmalek et al., 2012). Im GalN/TNF-Mausmodell für TNF-induzierten Leberschaden kann durch Fructose der apoptotische Zelltod, detektiert durch Serum-ALT, fast vollständig inhibiert werden (Latta et al., 2000). Daher wurde die Apoptose in XIM/LCMV/TNF-Mäusen und entsprechenden Kontroll-Tieren auch durch die intraperitoneale Injektion von Fructose 30 Minuten vor TNF inhibiert.

Es zeigte sich, dass XIM-DILI nach TNF auch bei Mäusen, die mit dem RNA-Virus LCMV infiziert sind durch Capsase-Blockierung inhibiert werden kann (**Abb. 16a/b**).

Die Behandlung mit Fructose verminderte die Hepatotoxizität in LCMV/TNF-Mäusen im gleichen Maß wie der pan-Caspase Inhibitor. Beide Substanzen führten in XIM/LCMV/TNF-Mäusen zu einer vollständigen Inhibition des Leberschadens und hoben die Mortalität von XIM vollständig auf (**Abb. 16a/b**).

Durch Apoptose-Inhibition wurden XIM/LCMV-Mäuse vor dem verstärkten Leberschaden nach TNF-Injektion geschützt und die Mortalität von 75 % auf 0 % gesenkt. Dabei zeigten der pan-Caspase Inhibitor und Fructose einen vergleichbaren Effekt auf die ALT-Freisetzung in das Blut und auf das Überleben der Mäuse. Da LCMV/TNF-Mäuse durch Inhibition der Apoptose vor XIM-DILI geschützt werden konnten, sterben die XIM/LCMV/TNF-Mäuse folglich an den Folgen einer verstärkten Apoptose von Leberzellen und andere

Zelltodmechanismen wie Nekrose oder Nekroptose sind nicht, oder zumindest nicht primär, involviert.



**Abb. 16: Protektiver Effekt von Caspase-Inhibition auf XIM-DILI bei LCMV Infektion.**

Wt-Mäuse wurde für 7 Tage entweder XIM (1 mg/Maus/d) oder Carrier p.o. verabreicht. An Tag 5 fand die Infektion der Mäuse mit  $5 \times 10^8$  PFU LCMV i.v. statt. An d 7, 2 Tage nach Infektion, wurde, 80 Min nach letztmaliger XIM- oder Carrier-Administration der pan-Caspase Inhibitor Q-VD-OPH oder Fruktose i.p. gespritzt. 110 Min nach der letzten XIM- oder Carrier-Behandlung wurden 400 ng TNF i.v. injiziert. Die ALT-Messung wurde 0 h, 2 h und 4 h nach TNF durchgeführt. **(a)** Stellt die im Serum gemessenen ALT-Konzentration 0 h, 2 h und 4 h nach TNF dar. In **(b)** ist das Überleben der Mäuse über die Zeit im Kaplan-Meier Plot abgebildet. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente mit 4 Mäusen pro Gruppe. Für die Berechnung der Signifikanz wurde der zweiseitige Student's t-Test verwendet (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ).

In weiteren Versuchen wurde untersucht, wie die verstärkte Apoptose von Leberzellen der XIM/Virus/TNF-Mäuse zustande kommt. Da das endoplasmatische Retikulum und das Mitochondrium zentrale Elemente bei der Induktion bzw. Weiterleitung und Amplifikation der Apoptose sind, wurde ihre Rolle im XIM-induzierten Leberschaden im Folgenden untersucht.

## 4.9 Keine Induktion von ER-Stress durch Virusinfektion oder XIM

Als Organelle eukaryotischer Zellen spielt das endoplasmatische Retikulum (ER) eine zentrale Rolle bei einer Vielzahl von zellulären Prozessen. Am und im ER finden Translation, Faltung, Qualitätskontrolle sowie posttranslationale Modifikationen von Proteinen statt. Des Weiteren ist das ER in den Transport von Transmembran- und sekretorischen Proteinen involviert. Auch fungiert das ER als intrazellulärer Calcium-Speicher, womit ihm eine Schlüsselrolle in der Signaltransduktion und bei zellulären Stressreaktionen zukommt.

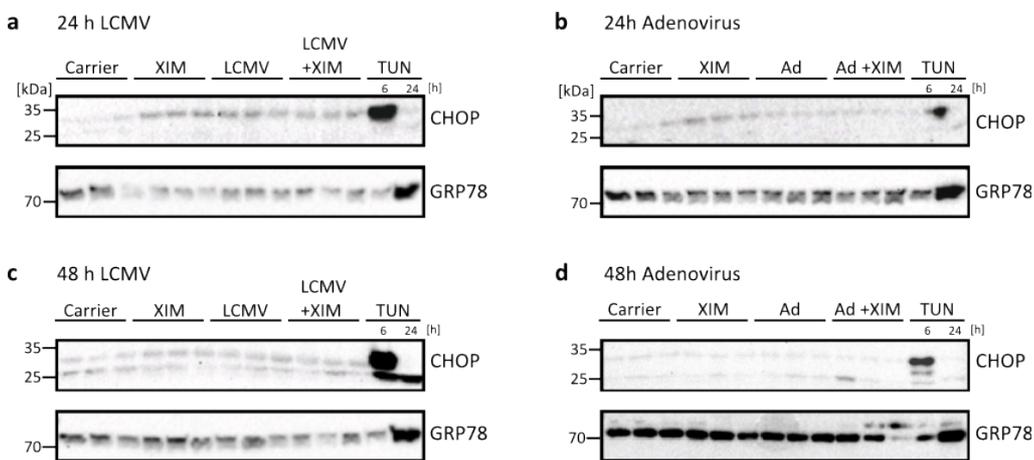
Störungen der normalen Funktionen des ER führen zu einer evolutionär konservierten Zellstressantwort, der sogenannten „*Unfolded Protein Response*“ (UPR). Die UPR wird durch die Ansammlung von Proteinen mit fehlerhafter Faltung im ER ausgelöst. Durch GSH-Depletion oder oxidativen Stress, beispielsweise induziert durch Medikamente, kann es zur Induktion von ER-Stress kommen (Nagy et al., 2010). Neben Medikamenten können auch UV-Strahlung oder Insulinresistenz ER-Stress hervorgerufen (Özcan et al., 2004). Da die Leber das Zielorgan vieler Medikamente ist, ist hepatischer ER-Stress, neben mitochondrialer Dysfunktion und oxidativem Stress, ein bedeutender Faktor, über den Medikamente ihre Toxizität ausüben können (Foufelle and Fromenty, 2016; P and Gumusel B, 2015). Neben Arzneimitteln können auch virale Infektionen ER-Stress induzieren (He, 2006). Eine kurzzeitige UPR reduziert ER-Stress und ermöglicht das Überleben von Zellen, wohingegen exzessiver und lang-andauernder ER-Stress, wie er durch längere Medikamentenexposition hervorgerufen werden kann, Apoptose auslöst (Hotamisligil, 2010).

Während des ER-Stress ist die Proteinbiosynthese herabreguliert, nur eine kleine Gruppe von Genen wird verstärkt transkribiert und translatiert. Darunter sind das ER-Chaperon GRP78 (engl.: *78 kDa glucose-regulated protein*) und CHOP (engl.: *C/EBP homologous protein*). Beide Proteine sind in die Vermittlung der Apoptose involviert und eignen sich durch ihre verstärkte Expression als ER-Stress Marker (Samali et al., 2010).

Wt-Mäuse wurden für 6 oder 7 Tage mit XIM oder Carrier behandelt, an Tag 5 mit Virus infiziert (LCMV oder AdGOL), die Lebern 24 oder 48 Stunden nach Virusinfektion entnommen und die Expression von GRP78 und CHOP im Immunoblot untersucht. Als Posi-

tivkontrolle diente Tunicamycin, ein Antibiotikum, das die Glykosylierung von neusynthetisierten Proteinen im ER vermindert, wodurch die Faltung der Proteine verhindert wird, die UPR aktiviert und letztendlich ER-Stress hervorgerufen wird (Foufelle and Fromenty, 2016).

Die Proteinexpression von CHOP und GRP78 ist weder 24 h noch 48 h nach Virusinfektion erhöht. Dabei zeigen sich keine Unterschiede zwischen LCMV und Adenovirus infizierten Mäusen (**Abb. 17**). Auch die Behandlung mit XIM induziert keine verstärkte Expression der ER-Stress Marker. Weder die alleinige Verabreichung, noch die Kobehandlung von Mäusen mit XIM und Virus löst eine erhöhte Proteinbiosynthese von CHOP und GRP78 aus.



**Abb. 17: Die Expression der ER-Stress Marker CHOP und GRP78 ist durch Virusinfektion und/oder XIM-Behandlung nicht verändert.**

Wt-Mäuse wurden peroral für 7 Tage mit XIM (1 mg/Maus/d) oder Carrier behandelt. An Tag 5 wurden die Mäuse intravenös mit LCMV oder AdGOL infiziert. Die Lebern wurden 24 h (**a, b**) oder 48 h (**c, d**) nach Infektionen entnommen und die Expression der Proteine CHOP und GRP78 im Western Blot untersucht. Als Positivkontrolle wurde Tunikamycin 6 h oder 24 h vor Leberentnahme i.p. appliziert. Dargestellt ist die Expression von CHOP und GRP78 24 h nach LCMV (**a**) oder AdGOL (**b**) Infektionen. (**c**) Zeigt die Proteinexpression 48 h nach LCMV Infektion; in (**d**) wird die Expression 48 h nach Adenovirus-Infektion abgebildet. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente mit 3 Mäusen pro Gruppe.

Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass weder durch Infektion mit dem Doppelstrang-DNA-Virus AdGOL oder dem Einzelstrang-RNA-Virus LVMV, noch durch das Medikament XIM ER-Stress ausgelöst wird. Es kann also ausgeschlossen werden, dass ER-Stress eine Rolle beim XIM-induzierten viralen Leberschaden spielt. Anders als beispiels-

weise für die Medikamente Diclofenac, Efavirenz, Furosemid, Indomethacin, Sertralin, Troglitazon und Paracetamol, dessen leberschädigende Wirkung mit ER-Stress verknüpft ist (Foufelle and Fromenty, 2016), führt XIM oder Virusinfektion nicht zu ER-Stress und dieser trägt folglich nicht zum XIM-vermittelten viralen Leberschaden bei.

Da Stress des ER nicht zur Pathogenese von XIM-induziertem viralen Leberschaden beiträgt, wurde der Mechanismus der XIM-vermittelten Leberschädigung im folgenden weiter untersucht. In Hepatozyten sind Mitochondrien zentrales Element der Apoptose. Daher wurde der Einfluss von XIM auf Mitochondrien von Adenovirus-infizierten Mäusen ermittelt, welche entweder für kurze Zeit *ex vivo* oder für mehrere Tage *in vivo* XIM ausgesetzt wurden.

#### **4.10 Einfluss von XIM auf die Sensitivität von Mitochondrien gegenüber dem Stresstimulus Calcium**

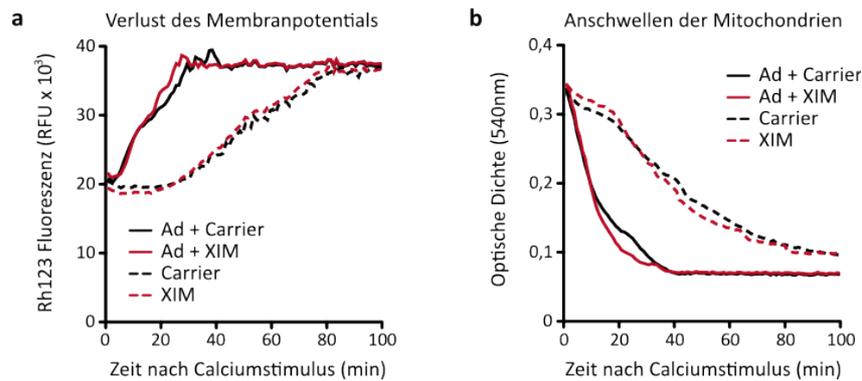
Mitochondrien sind das zentrale Element der Apoptose in Hepatozyten. Nach TNF-Rezeptor-Stimulation erfolgt die Verstärkung der relativ schwachen Initiator-Caspase-Aktivierung durch Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren aus dem Intermembranraum der Mitochondrien. Dadurch kommt es zur massiven Aktivierung von Effektor-Caspasen und damit letztlich zum Zelltod durch Apoptose. Daher können Schädigungen der Mitochondrien durch Medikamente einen Einfluss auf den Ablauf der Apoptose haben oder diese sogar initiieren (Szewczyk and Wojtczak, 2002). Eine Vielzahl von Medikamenten, wie beispielsweise XIM, Paracetamol oder verschiedene Antibiotika, können oxidativen Stress hervorrufen, der in der Folge in einer Schädigung von Mitochondrien resultiert (Kalghatgi et al., 2013; Neve et al., 2015; Ramachandran et al., 2011a, 2011b). Diese Schädigung zeigt sich in einer veränderten mitochondrialen Außenmembran-Permeabilität (engl.: *mitochondrial outer-membrane permeability*, MOMP) oder mitochondrialen Permeabilitätstransition (engl.: *mitochondrial permeability transition*, MPT). Das Medikament XIM reduziert die mitochondriale Atmung, verändert den Redoxstatus und vermindert den GSH-Level von Zellen, was auf oxidativen Stress durch mitotoxische Metabolite hindeutet (Neve et al., 2015).

Da die Untersuchung der Caspase-Aktivierung gezeigt hat, dass XIM in virusinfizierten Mäusen die Aktivierung der ausführenden Caspasen, nicht aber der Initiator-Caspase 8, verstärkt, lag die Vermutung nahe, dass XIM einen Einfluss auf Mitochondrien hat, da diese Einfluss auf die Verstärkung des apoptotischen Signals in Hepatozyten haben.

Daher wurde die Sensitivität von Mitochondrien gegenüber des Stress-Stimulus Calcium untersucht. Wenn Mitochondrien mit einer pathologischen Menge an Calcium behandelt werden kommt es zur Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP), was letztlich zum Anschwellen der Mitochondrien führt und im Verlust des Membranpotentials resultiert (siehe Kap. 3.10).

Zuerst wurde der Einfluss von XIM auf isolierte hepatische Mitochondrien *ex vivo* untersucht (**Abb. 18**). Dazu wurde ein Teil der Wt-Mäuse mit AdLacZ infiziert und an Tag 2 nach Infektion fand wurde die Leber entnommen und die Mitochondrien isoliert. Nach 30 minütiger Inkubation der Mitochondrien mit XIM oder Carrier wurde die Veränderung des Membranpotentials und der Schwellung nach Calciumgabe ermittelt. Das Membranpotential wurde durch Zunahme der Rhodamin123 Fluoreszenz detektiert, die Schwellung wurde als Verlust der Optischen Dichte über die Zeit gemessen.

Dabei zeigten sich zwischen Mitochondrien aus Adenovirus-infizierten und gesunden Mäusen deutliche Unterschiede in der Sensitivität gegenüber Calcium. Mitochondrien von Virus-infizierten Mäusen verloren ihr Membranpotential nach Calcium-Stimulus deutlich schneller, als Mitochondrien aus nicht-infizierten Mäusen (**Abb. 18a**). Des Weiteren war ein schnelleres Anschwellen der infizierten Mitochondrien nach Calciumstimulation vorhanden (**Abb. 18b**). Die Behandlung von isolierten Mitochondrien mit XIM – egal ob aus infizierten oder gesunden Lebern gewonnen – hatte keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit mit der Mitochondrien ihr Membranpotential nach Calcium-Gabe verloren (**Abb. 18a**). Auch auf die Geschwindigkeit des Anschwellens hatte die Vorbehandlung der Mitochondrien mit XIM keinen Einfluss (**Abb. 18b**).



**Abb. 18: Mitochondrien von *ex vivo* XIM-behandelten Mäusen zeigen keine veränderte Sensitivität gegenüber Calcium.**

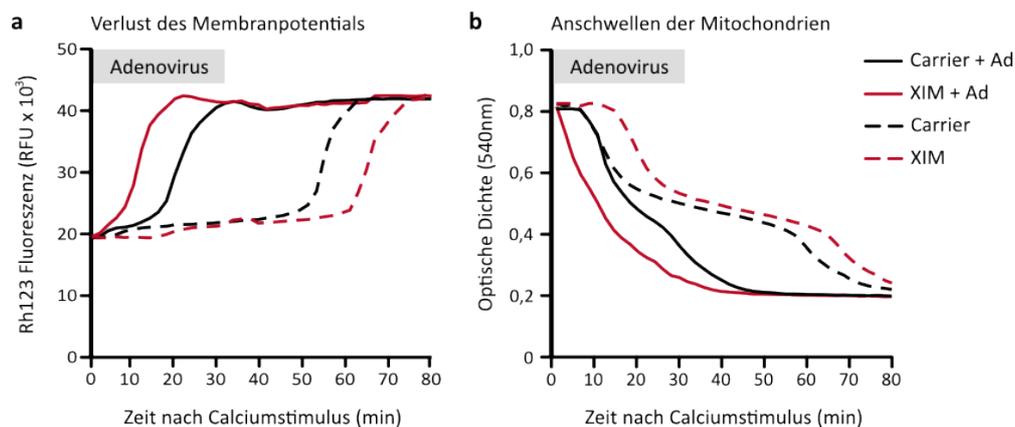
Wt-Mäuse wurden mit  $1 \times 10^9$  PFU AdLacZ i.v. infiziert oder NaCl injiziert. 2 Tage nach Infektion wurden die Lebern entnommen. Jede Gruppe umfasste 2 Mäuse; die Lebern wurden für die Mitochondrienisolation gepoolt. Die isolierten Mitochondrien wurden *ex vivo* für 30 Min mit XIM oder Carrier behandelt. **(a)** Durch Messung der Rhodamin123 Fluoreszenz über die Zeit nach Calciumstimulus wurde der Verlust des Membranpotentials der Mitochondrien untersucht. In **(b)** ist das Anschwellen der Mitochondrien durch Messung der Optischen Dichte über die Zeit nach Calciumstimulus abgebildet. Die Bestimmung der Rh123 Fluoreszenz und der Optischen Dichte wurde in Triplikaten durchgeführt, dessen Werte für die Auswertung gemittelt wurden. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die *ex vivo* Behandlung von Mitochondrien mit XIM keinen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber Calcium hatte. Weder das Membranpotential noch das Anschwellen der Mitochondrien – unabhängig davon ob sie aus Virusinfizierten Lebern gewonnen wurden oder nicht – wurde durch die kurzzeitige *ex vivo* Behandlung mit XIM beeinflusst.

Medikamente, die eine ideosynkratische Leberschädigung hervorrufen können, tun dies häufig mit einer Latenz von einem Monat bis zu einem Jahr (Kaplowitz, 2001). So zeigte sich auch die Hepatotoxizität von XIM erst in Langzeitstudien (Lee et al., 2005). Es ist daher denkbar, dass der toxische Effekt von XIM auf Mitochondrien erst nach einer längeren Exposition mit dem Medikament auftritt.

Daher wurde in folgenden Versuchen eine längere *in vivo* Exposition der Mitochondrien mit XIM gewählt. Dazu wurde Wt-Mäusen für 7 konsecutive Tage mit XIM behandelt. An Tag 5 fand die Infektionen mit Adenovirus statt und an Tag 7 wurden die Lebern entnommen, die Mitochondrien isoliert und das Membranpotential sowie das Anschwellen der Mitochondrien nach Calcium-Exposition untersucht. Wie in **Abb. 18** gezeigt, haben Mit-

ochondrien, die aus Lebern von Adenovirus-infizierten Mäusen isoliert wurden eine geringere Toleranz gegenüber Calcium verglichen mit Mitochondrien gesunder Mäuse: Der Verlust des Membranpotentials und das Anschwellen der Mitochondrien geschieht schneller (**Abb. 19**). Im Gegensatz zur kurzzeitigen *ex vivo* Behandlung mit XIM hatte die mehrtägige *in vivo* Verabreichung von XIM einen deutlichen Effekt auf die Mitochondrien (**Abb. 19**). Wurden die Mäuse für 7 Tage mit XIM behandelt, zeigte sich in gesunden Mitochondrien, dass der Verlust des Membranpotentials nach Calcium-Stimulus langsamer eintrat als bei Carrier-behandelten Mäusen (**Abb. 19a**). Im Gegensatz zum späteren Verlust des Membranpotentials bei gesunden XIM-Mäusen steht die Beobachtung, dass Mitochondrien von XIM/Virus-Mäusen ihr Membranpotential schneller verlieren als die Mitochondrien von Carrier/Virus-Mäusen (**Abb. 19a**).



**Abb. 19: Mitochondrien von *in vivo* XIM-behandelten und Adenovirus-infizierten Mäusen sind sensibler gegenüber Calcium.**

Wt-Mäuse wurden peroral für 7 Tage entweder mit XIM (1 mg/Maus/d) oder Carrier behandelt. An Tag 5 fand die Infektion der Mäuse mit  $1 \times 10^9$  PFU AdLacZ i.v. statt. An d 7, 110 Min nach XIM- oder Carrier-Administration, wurden die Lebern entnommen. Jede Gruppe umfasste 2 Mäuse, dessen Lebern für die anschließenden Mitochondrienisolation gepoolt wurden. **(a)** Durch Messung der Rhodamin123 Fluoreszenz über die Zeit nach Calciumstimulus wurde der Verlust des Membranpotentials der Mitochondrien untersucht. In **(b)** ist das Anschwellen der Mitochondrien durch Messung der Optischen Dichte bei 540 nm über die Zeit nach Calciumstimulus abgebildet. Die Bestimmung der Rh123 Fluoreszenz und der Optischen Dichte erfolgte in Triplikaten, die für die Auswertung gemittelt wurden. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen des Anschwellens: Mitochondrien von XIM/Virus-Mäusen schwellen nach Calcium-Gabe schneller an als Mitochondrien von Carrier/Virus-Mäusen (**Abb. 19b**).

Die Ergebnisse zeigen, dass nur die mehrtägige perorale Verabreichung von XIM Einfluss auf die hepatischen Mitochondrien von Adenovirus-infizierten Mäusen hat. Die kurzfristige *ex vivo* Behandlung der Mitochondrien mit XIM beeinflusste das Membranpotential und die Schwellung nicht. Dabei machte es keinen Unterschied, ob die Mitochondrien aus virusinfizierten oder gesunden Lebern gewonnen wurden.

Zudem haben nur Mitochondrien von XIM/Virus-kobehandelten Mäusen eine gesteigerte Anfälligkeit dem Stress-Stimulus Calcium gegenüber. Mitochondrien aus gesunden Mäusen zeigten weder eine gesteigerte Schwellung noch ein reduziertes Membranpotential.

Wie eine Vielzahl hepatotoxischer Medikamente scheint XIM folglich einen toxischen Effekt auf Mitochondrien zu haben. Allerdings nur auf Mitochondrien virusinfizierter Hepatozyten. Die Ergebnisse von *ex vivo* Untersuchungen mit primärer humanen Hepatozyten haben gezeigt, dass XIM oxidativen Stress und eine reduzierte mitochondriale Atmung durch mitotoxische Metabolite ausgelöst (Neve et al., 2015). Möglicherweise stehen die gleichen Mechanismen auch hinter der verstärkten Schwellung der Mitochondrien und dem reduzierten Membranpotential nach Calzinstimulus in XIM/Virus-Mäusen.

## 5 DISKUSSION

Die Leber ist durch ihre anatomische Lage kontinuierlich einer Flut von Pathogenen, Nahrungskomponenten und Xenobiotika ausgesetzt. Zudem ist das Organ durch seine metabolische Funktion besonders anfällig gegenüber schädigenden Medikamenten, die DILI hervorrufen können. Dabei wird vermutet, dass unterschwellige virale Infektionen zu einem pro-inflammatorischen Status führen, und somit ein Risikofaktor für die Entstehung von DILI darstellen. Zudem kommt es in Patienten mit viralen Infektion vermehrt zu DILI. In der vorliegenden Arbeit wurde der bisher weitgehend unbekannt Mechanismus der Leberschädigung durch XIM charakterisiert. Der Thrombin-Inhibitor Exanta® wurde 2006 vom europäischen Markt genommen, da der Wirkstoff XIM in Einzelfällen eine schwere Hepatotoxizität auslöste. Da die Ursache der Leberschädigung weitgehend unbekannt war, wurden zwei Maus-Modelle etabliert, um den Mechanismus aufzuklären. Im ersten Modell wurde die Infektion mit Adenovirus oder LCMV mit XIM kombiniert und die Leberschädigung und Mortalität über die Zeit beobachtet. Im zweiten Modell wurde zusätzlich das Zytokin TNF injiziert (siehe Kap.3.4.8, Abb. 2). In beiden Modellen zeigte sich, dass Mäuse, die zusätzlich mit XIM behandelt wurden, eine verstärkte Apoptose der Hepatozyten und Mortalität aufwiesen. Dabei waren NK/NKT Zellen und CTL zentrale Mediatoren der Hepatotoxizität, welche in beiden Modellen durch TNF vermittelt wurde. Zudem spielten Mitochondrien eine wichtige Rolle, da diese nach mehrtägiger XIM-Exposition eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber dem Stress-Stimulus Kalzium aufwiesen, ihr Membranpotential schneller verloren und daher zu einer verstärkten Aktivierung von Effektor-Caspasen in XIM/Virus-Tieren führten.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen somit erstmals den Mechanismus der XIM-vermittelten Leberschädigung im Mausmodell. Diese Erkenntnisse könnten helfen, die Hepatotoxizität auch von anderen Arzneimitteln auf molekularer Ebene aufzudecken und sie könnten sich zudem bei der präklinischen Entwicklung neuer Medikamente als hilfreich erweisen.

## **5.1 XIM ruft in Mäusen einen verstärkten viralen Leberschaden hervor und führt zur Mortalität**

Epidemiologische Daten zeigen, dass die Inzidenz für DILI in Patienten mit viralen Infektion (HIV, HBV, HCV oder HBV/HCV Koinfektion) deutlich erhöht ist (Bonacini, 2004; den Brinker et al., 2000; Kim et al., 2016; Ungo et al., 1998; Wong et al., 2000; Wu et al., 1990). Laut inflammatorischer Stress Hypothese können unterschwellige virale oder bakterielle Infektionen zu entzündungsbedingtem Stress führen, wodurch die Leber anfällig für schädliche Noxen wird. Die Störungen der Homöostase können dazu führen, dass hepatisch metabolisierte Medikamente eine toxische Wirkung auf das Organ entwickeln. Die Inflammatorische Stress Hypothese wird durch Daten aus Experimenten mit Mäusen gestützt. So ruft die Administration von Poly I:C, einem RNA-Mimetikum das Infektionen mit RNA-Viren nachahmt, nach Halothan-Gabe eine verstärkte Hepatotoxizität hervor (Cheng et al., 2009a). Da Mechanismus der XIM-vermittelten Leberschädigung bisher weitgehend unbekannt war wurde ein Maus-Modell entwickelt, in dem die Wirkung von XIM auf die Leber von virus-infizierten Mäusen untersucht wurde. Dabei zeigte sich, dass Hepatotoxizität und Mortalität in Tieren, die XIM ausgesetzt waren, stark anstiegen.

Der Zeitpunkt der Medikamentenverabreichung nach einem inflammatorischen Stimulus kann entscheidend für Induktion von DILI sein. So findet sich bei Paracetamol eine biphasische Hepatotoxizität nach Vorbehandlung mit dem RNA-Mimetikum PolyI:C (Kalabis and Wells, 1990). Wird Paracetamol Wt-Mäusen innerhalb von 16 Tagen nach Poly I:C verabreicht, ist die Hepatotoxizität vollständig inhibiert. Infektionsversuche mit einem replikationsdefizientem Adenovirus bestätigten, dass eine akute virale Hepatitis die Toxizität von Paracetamol weitestgehend inhibiert (Getachew et al., 2010). Der Grund liegt in der Induktion von Typ I Interferonen durch Poly I:C oder Adenovirus (Matsumoto and Seya, 2008; Yamaguchi et al., 2010). Dadurch werden wiederum Paracetamol-metabolisierende Cytochrom P450 Isoformen herabreguliert und somit die Metabolisierung zum toxischen Abbauprodukt NAPQI verhindert. Wird Paracetamol allerdings erst 23 Tage nach Poly I:C verabreicht, kommt es aufgrund von verstärkter katalysierter Bioaktivierung zu einem 20-fach stärkeren Leberschaden (Kalabis and Wells, 1990). Bei XIM ist ein Einfluss der Virusinfektion auf die Verstoffwechslung des Medikamentes allerdings aus

zwei Gründen unwahrscheinlich: Zum einen wird XIM nicht durch Cytochrom P450 Enzyme metabolisiert, zum anderen wurde XIM in den beiden Modellen für XIM-DILI zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor und nach Virusinfektion verabreicht. Da XIM in beiden Fällen eine erhöhte Hepatotoxizität und Mortalität induziert, scheint der Zeitpunkt der XIM-Verabreichung keinen Einfluß auf die Toxizität zu haben. Die verstärkte Toxizität nach Virusinfektion ist folglich unabhängig von einer veränderten Metabolisierung nach Virusinfektion.

## **5.2 Verstärkter Leberschaden und Mortalität sind spezifisch für XIM**

Um zu untersuchen, ob XIM-DILI auf der Inhibition des Koagulationssystems beruht, wurde der Effekt von weiteren direkten oralen Thrombininhibitoren anstelle von XIM im XIM-DILI Modell getestet.

Die Exposition mit den direkten oralen Thrombininhibitoren AZD und DAB, oder mit MEL, dem dem aktiven Wirkstoff von XIM, ruft in Virus/TNF-Mäusen keine verstärkte Hepatotoxizität und Mortalität hervor, wie durch Ermittlung der sALT-Aktivität und des Überlebens gezeigt wird. Die Leberschädigung durch XIM wird im etablierten Mausmodell folglich nicht durch einen Kasseneffekt von direkten Antikoagulantien hervorgerufen, sondern ist spezifisch für das DILI-assoziierte Medikament XIM.

Wünschenswerte Eigenschaften eines Tiermodells für DILI beinhalten zwei Kriterien: 1) das Hervorgerufen eines Leberschadens in einem großen Anteil von Tieren, die sich leicht und kostengünstig züchten lassen und 2) die Möglichkeit zwischen Arzneimitteln, die in Menschen eine Leberschädigung hervorgerufen und denen, die nicht mit iDILI assoziiert sind zu unterscheiden (Roth and Ganey, 2011). Beim Modell für XIM-DILI sind beide Kriterien erfüllt: XIM ruft in Wt-Mäusen zum einen verlässlich einen Leberschaden und in 50-75 % Mortalität hervor, zum anderen führen die direkten Thrombininhibitoren AZD und DAB, wie im Menschen, auch in Mäusen nicht zu einer Leberschädigung.

Die Ergebnisse für AZD, die Nachfolgesubstanz von XIM, stimmen mit Daten aus klinischen Studien überein. Wie auch im Mausmodell zeigte AZD in klinischen Studien keine hepatotoxischen Eigenschaften verglichen mit dem Vitamin K Antagonisten Warfarin oder DAB (Lip et al., 2009). Allerdings handelt es sich dabei um Studien vor Marktzulas-

sung, wodurch weniger Patienten mit dem Arzneimittel behandelt wurden und idiosyncratischer Leberschaden durch seine niedrige Prävalenz eventuell nicht auftritt. Vergleicht man allerdings den Anteil von Patienten, die in klinischen Studien erhöhte Leberwerte aufwiesen, so lag der Anteil bei XIM mit 7,9 % deutlich über dem von AZD mit 2,3 %, wodurch eine leberschädigende Wirkung von AZD als unwahrscheinlich erscheint (Lee et al., 2005; Lip et al., 2009).

Die unterschiedliche Hepatotoxizität von XIM und AZD lässt sich möglicherweise durch Unterschiede in der Pharmakokinetik erklären. An der Metabolisierung von AZD sind, anders als bei XIM, Cytochrom P450 Enzyme beteiligt. AZD wird in zwei Schritten metabolisiert: Zuerst durch die Cyp P450 Isoenzyme 3A4, 2C9, 2C19 und anschließend durch ein N-hydroxyamin Reduktase System (Matsson et al., 2011). Virusinfektionen führen zu einer veränderten Expression von Cyp P450 Enzymen. So sind die Level von Cyp2C9 und Cyp2C19 bei HCV Infektion stark herabreguliert (Tsunedomi et al., 2005). Eine Infektion mit Adenovirus Typ 5 resultiert in einer 70 % igen Reduktion der Cyp3A-Expression (Jonsen-Schmunk et al., 2016). Möglicherweise beeinträchtigt die Adenovirus Infektion somit die Verstoffwechslung von AZD und verhindert dadurch die Bildung von hepatotoxischen Metaboliten. Da es sich bei AZD um ein Prodrug handelt, dass erst nach Metabolisierung als Thrombininhibitor fungiert, könnte die Bestimmung der Haemaclot Thrombinzeit in weiteren Versuchen indirekt Aufschluss über die AZD-Metabolisierung geben.

Der direkte, oral verfügbare Thrombininhibitor DAB wird über Esterasen und nicht über Cytochrom P450 zu Dabigatran metabolisiert (Blech et al., 2008). Daher kann, wie bei XIM, ein Einfluss der Virusinfektion auf die Verstoffwechslung ausgeschlossen werden. Im Menschen, und auch im verwendeten Tiermodell für DILI, führt DAB nicht zur Leberschädigung (Caldeira et al., 2014).

### **5.2.1 Einfluss auf die Gerinnung auf XIM-DILI**

Ein Einfluss der Thrombininhibition auf den TNF-induzierten viralen Leberschaden kann ausgeschlossen werden, da nur XIM, und nicht MEL, AZD und DAB zur Hepatotoxizität führen. Anders als bei der nicht-alkoholische Steatohepatitis, bei der die direkten Thrombininhibitoren DAB oder Argatroban zu einer Reduktion des hepatozellulären Schadens

und der Inflammation führen (Kassel et al., 2012; Kopec et al., 2014), hat die Hemmung von Thrombin in diesem Modell keinen Einfluss auf Stärke der Hepatotoxizität.

Auch auf die Infektionseffizienz hat die Thrombininhibition mit XIM, wie durch Messung der Biolumineszenz gezeigt, keine Auswirkungen. Anders als beim Serotyp 2 des Adeno-assoziierten Virus, bei dem die Transfektion durch Thrombininhibition reduziert wird (Schuettrumpf et al., 2006), ist dies beim verwendeten Adenovirus nicht der Fall.

Durch Virusinfektion ist die Blutgerinnung für etwa einen Tag vermindert, gemessen als Hemolclot Thrombinzeit. Ein Grund könnte eine verminderte renale und hepatische Elimination von Thrombininhibitoren sein. Durch Adenovirusinfektion werden die Mäuse geschwächt und nehmen weniger Nahrung/Flüssigkeit zu sich, wodurch die Ausscheidung reduziert sein könnte. Allerdings ist die Gerinnung in allen Adenovirusinfizierten Gruppen – unabhängig von der Behandlung mit Thrombininhibitoren – vermindert, was einen Einfluss der Antikoagulantien ausschließt.

Das Adenovirus Typ 5 bindet die Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren FX, FVII, FIX, wodurch der Eintritt des Virus in die Hepatozyten ermöglicht wird (Irons et al., 2013; Nemerow, 2013; Parker et al., 2006; Shayakhmetov et al., 2005; Waddington et al., 2008; Xu et al., 2013b). Möglicherweise kommt es somit durch Infektion zu einer Senkung des Serumspiegels dieser Koagulationsfaktoren, wodurch die Blutgerinnung langsamer abläuft. Die genannten Gerinnungsfaktoren haben allerdings keinen direkten Einfluss auf die Hemoclot Thrombinzeit, da bei diesem Test nur die Zeit bis zur vollständigen Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin nach Thrombinzugabe gemessen wird (van Ryn et al., 2010). Dadurch kann die Bindung des Virus an verschiedener Gerinnungsfaktoren als Grund für die verminderte Blutgerinnung ausgeschlossen werden.

Möglicherweise hat die Virusinfektion Einfluss auf die auf die Freisetzung von Fibrinogen aus Hepatozyten oder der Serumspiegel ist aufgrund eines erhöhten Verbrauches reduziert. Zumindest *in vitro* resultiert die Inkubation von humanen Adenovirus Typ 3 mit Vollblut in einem reduzierten Fibrinogen-Level (Jin et al., 2014).

### **5.3 Der Mechanismus von XIM-DILI unterscheidet sich vom LPS-Modell für DILI**

Die Koadministration von XIM und Lipopolysaccharid löste keinen Leberschaden aus, wie durch Bestimmung der sALT-Aktivität determiniert wurde (Kap. 4.5). Eine Vielzahl von iDILI-assoziierten Arzneimitteln (TVX, Ranitidin, Sulindac, Chlorpromazin, Halothan, Amiodaron, Diclofenac) führen in Nagern nach Administration mit dem Inflammagen LPS zu erhöhtem Leberschaden, während Arzneimittel der gleichen pharmakologischen Klasse, die nicht mit Hepatotoxizität assoziiert sind, keinen toxischen Effekt haben (Buchweitz et al., 2002; Cheng et al., 2009a; Deng et al., 2006, 2009; Luyendyk et al., 2003; Waring et al., 2006; Zou et al., 2009). Die Selektivität des LPS-Modells spricht für eine Rolle von inflammatorischem Stress bei der Entstehung von humanem iDILI. Der Mechanismus der Hepatotoxizität von XIM scheint sich allerdings von der LPS-induzierten Toxizität abzugrenzen, da der alleinige Stimulus von LPS nicht ausreichte um einen Leberschaden in XIM-Tieren zu induzieren. Der durch LPS-Koadministration ausgelöste Leberschaden ist TNF abhängig und kann Anstelle von LPS auch durch TNF induziert werden (Shaw et al., 2009c). Anscheinend sind die durch TNF ausgelösten Signalprozesse in Hepatozyten kombiniert mit iDILI-assoziierten Medikamenten essentiell für das Hervorrufen eines Leberschadens. Wie in Kontrollen anderer Experimente gezeigt, reicht bei XIM die alleinige Koadministration mit TNF nicht aus, um einen Leberschaden auszulösen. Dies spricht dafür, dass sich der Mechanismus von XIM-DILI von dem anderer DILI-assoziiertes Medikamente unterscheidet. Essentiell für die Entwicklung der Hepatotoxizität durch XIM scheint die Kombination von Virusinfektion und TNF zu sein. Nur die durch Virusinfektion veränderte Leberzell-Homöostase und die zusätzliche Administration von TNF und das dadurch ausgelöste TNF-Signaling in den Hepatozyten führen in Kombination mit XIM zu Hepatotoxizität. Die alleinige Kombination von XIM mit Virusinfektion oder von XIM mit TNF ist nicht ausreichend für die Ausbildung der Leberschädigung und die Mortalität der Mäuse.

## 5.4 Der Einfluss von Leber-assoziierten Lymphocyten auf XIM-DILI

Die Depletion von NK/T Zellen und CTL durch den NK1.1 Antikörper (M K Slifka, 2000) verhindert den XIM-induzierten Leberschaden nach Virusinfektion. Folglich sind NK Zellen, NKT Zellen oder CTL für den verstärkten Leberschaden und die Mortalität der XIM/Virus-Mäuse verantwortlich. Allerdings schützt die alleinige Abwesenheit von NKT Zellen und CTL Mäuse nicht vor XIM-DILI, sondern  $rag-2^{-/-}$  Mäuse sind im Gegenteil besonders schwer von XIM-DILI betroffen. Durch Fehlende V(D)J Rekombination sind  $rag-2^{-/-}$  Mäuse – neben der fehlenden Fähigkeit reife T oder B Zellen zu bilden – auch nicht in der Lage funktionale NKT Zellen und CTL zu generieren (Shinkai et al., 1992). Die Anzahl funktionaler NK Zellen ist hingegen nahezu gleich (Mombaerts et al., 1994). Da in  $rag-2^{-/-}$  Tieren NK Zellen die einzigen Immunzellen sind, die Virus-infizierte Zellen eliminieren, scheinen diese eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von XIM-DILI auszuüben.

Die Aktivierung von NK/T Zellen durch Faktoren wie Poly I:C oder virale Infektionen verstärkt möglicherweise die Medikamenten-induzierte Hepatotoxizität (Gao et al., 2009). So führt die Verabreichung von Paracetamol im Lösungsmittel DMSO zu einer Aktivierung von NK/T Zellen und dadurch zu einer verstärkten Hepatotoxizität (Liu et al., 2004; Masson et al., 2008). Auch beim Poly I:C/Halothan Modell für DILI zeigt sich, dass die Aktivierung von NK Zellen eine starke Zunahme der Hepatotoxizität zur Folge hat und NKT Zell-defiziente CD1d Mäuse resistent gegenüber der Poly I:C/Halothan-induzierten Leberschädigung sind (Cheng et al., 2009a, 2010). Des Weiteren ist in Patienten mit einer HCV Infektion, die häufig mit der Aktivierung von NK/T Zellen einhergeht, das Risiko eine Paracetamol-induzierte Leberschädigung zu entwickeln erhöht (Nguyen et al., 2008).

XIM-behandelte Virus-infizierte  $rag-2^{-/-}$  Mäuse entwickeln schneller eine Schädigung der Leber und sterben schneller als Wt-Mäuse. Da  $rag-2^{-/-}$  Mäuse nahezu über die gleiche Anzahl von NK Zellen wie Wt-Mäuse verfügen (Mombaerts et al., 1994), scheint das Gleichgewicht von NK, NKT und CTL bei der Induktion der XIM-vermittelten Leberschädigung eine entscheidende Rolle zu spielen.

Um zu untersuchen, ob die Hepatotoxizität in  $rag-2^{-/-}$  Mäusen alleinig durch NK Zellen vermittelt wird, könnten in weiteren Versuchen NK Zellen durch Administration von NK1.1 oder anti-Asialo GM1 Antikörper depletiert werden und der Leberschaden und das

Überleben der Mäuse nach XIM Gabe ermittelt werden. Der Einfluss von NK Zell-sezerniertem TNF auf dem XIM-induzierten Leberschaden in  $\text{rag-2}^{-/-}$  Mäusen könnte durch die Verabreichung von TNF Antikörpern wie beispielsweise durch das Arzneimittel Infliximab bestimmt werden. Da eine vollständige Depletion von TNF mit Hilfe von Antikörpern eventuell nicht über mehrere Tage möglich ist, könnte die Kreuzung von  $\text{rag-2}^{-/-}$  Mäusen mit TNF-Rezeptor-defizienten Mäusen eine weitere Möglichkeit bieten, um die Rolle von TNF beim XIM-induzierten Leberschaden in  $\text{rag-2}^{-/-}$  Mäusen zu untersuchen. Auch in Wt-Mäusen könnte der Beitrag von NK/T Zellen durch Verabreichung der Antikörper NK1.1 oder anti-Asialo GM1 bestimmt werden.

Möglicherweise üben NKT Zellen im Modell der XIM-DILI einen protektiven Effekt aus und die Abwesenheit von NKT Zellen in  $\text{rag-2}^{-/-}$  Mäusen resultiert daher in einer verstärkten Hepatotoxizität. Auch bei Leberschädigung durch CCL4 oder durch Gallengangsligation schützen iNKT Zellen vor akuter Inflammation und Zerstörung des Gewebes (Park et al., 2009; Wintermeyer et al., 2009). Des Weiteren schützen Typ II NKT Zellen gegen den Con A-induzierten Leberschaden (Gao et al., 2009). Auch bei der NAFLD (engl.: *Non-alcoholic fatty liver disease*) haben NKT Zellen einen protektiven Effekt. Die Depletion von NKT Zellen fördert bei dieser Erkrankung die proinflammatorische Polarisation der hepatischen Zytokinproduktion und sensitiviert die Leber für die LPS-vermittelte Toxizität (Li et al., 2004). Des Weiteren kann durch probiotische Behandlung oder adaptiven Zelltransfer der hepatische NKT Zellspiegel erhöht werden und das Krankheitsbild der NAFLD verbessert werden (Elinav et al., 2006; Ma et al., 2008). Ein möglicher Hinweis darauf, dass das Gleichgewicht von NK und NKT Zellen in der Leber eine Rolle bei der Entwicklung von DILI spielt könnte auch die Beobachtung sein, dass DILI in übergewichtigen NAFLD-Patienten mittleren Alters mit einem fast vierfach erhöhte Risiko auftritt (Tarantino et al., 2007).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass NK Zellen eine zentrale Rolle in der Induktion der XIM-verstärkten viralen Hepatitis spielen. Das alleinige Vorhandensein von NK Zellen in  $\text{rag-2}^{-/-}$  Mäusen führt zu einem verstärkten Leberschaden und zu einer Mortalität wenige Tage nach Virusinfektion.

Da der Mechanismus der XIM-Hepatotoxizität über TNF Rezeptor Signalprozesse abläuft (siehe Kap. 4.3), scheint es bei  $rag-2^{-/-}$  Mäusen entweder weitere Faktoren neben TNF zu geben, welche die verstärkte Leberschädigung vermitteln oder es kommt zu einer besonders hohen Freisetzung von TNF. Die Produktion von TNF in NK Zellen ließe sich beispielsweise durch RT-PCR (engl.: *real-time quantitative PCR*) der mRNA untersuchen, oder die Freisetzung von TNF in das Serum der Mäuse könnte mittels ELISA (engl.: *enzyme-linked immunosorbent assay*) oder Immunoblot untersucht werden.

Der genaue Mechanismus und der Einfluss von NKT Zellen und CTL in der XIM-DILI ist nicht geklärt, es ist aber denkbar, dass NKT Zellen wie bei anderen Modellen der Medikamenten-induzierten Leberschädigung einen protektiven Effekt ausüben.

Zur weiteren Aufklärung der Rolle von LALs bei XIM-DILI könnten 1) NK Zellen in  $rag-2^{-/-}$  Mäusen durch NK1.1 oder anti-Asialo GM1 Antikörper depletiert werden, wodurch der verstärkte Leberschaden und die Mortalität verhindert werden sollten, 2) NK Zellen mit Hilfe des anti-Asialo GM1 Antikörper in Wt-Mäusen depletiert werden und so ihr Betrag zu XIM-DILI ermittelt werden, oder 3) CD1d defiziente Mäuse, die über keine NKT Zellen verfügen, im Modell für XIM-DILI verwendet werden.

## 5.5 Rolle von TNF bei XIM-DILI

Leber-residente NK Zellen sekretieren als Antwort auf inflammatorische Stimuli wie Vacciniaviren ein breites Spektrum von Zytokinen – darunter auch TNF (Daussy et al., 2014). Dadurch tragen NK Zellen möglicherweise zur verstärkten viralen Hepatitis nach XIM bei. Daher wurde die Rolle von TNF beim XIM-induzierten viralen Leberschaden mit Hilfe von  $TNF-R1/2^{-/-}$  Mäusen und durch intravenöse Verabreichung von TNF vor der endogenen Immunantwort in Wt-Mäusen untersucht.

### 5.5.1 $TNF-R1/2^{-/-}$ Mäuse sind vor XIM-DILI geschützt

Anders als in Wt-Mäusen, wurde in  $TNF-R1/2^{-/-}$  Mäusen der Leberschaden durch XIM bei einer Virusinfektion nicht verstärkt und es wurde keine Mortalität durch XIM ausgelöst. Die  $TNF-R1/2^{-/-}$  Tiere sind folglich vor der durch XIM verstärkten Leberschädigung protektiert. Da TNF-Rezeptor Doppelknockout Tiere verwendet wurden ist nicht bekannt, ob

TNF-Rezeptor 1 oder TNF-Rezeptor 2 maßgebend für die Hepatotoxizität durch XIM ist. Allerdings wurde gezeigt, dass im Modell der TNF-induzierten viralen Hepatitis die Leberschädigung über TNF-R1 vermittelt wird (Dissertation K. Gärtner, 2011).

Die Notwendigkeit der TNF-Rezeptoren um den erhöhten Leberschaden und die Mortalität von XIM zu induzieren zeigt, dass TNF eine zentrale Funktion beim der XIM-DILI übernimmt. Daher wurde das Modell der TNF-induzierten viralen Hepatitis (Wohlleber et al., 2012a) genutzt, um den Mechanismus des durch XIM verstärkten Leberschaden näher zu charakterisieren.

### **5.5.2 Der Einfluss von XIM auf das Modell der TNF-induzierten viralen Hepatitis**

Im Modell der TNF-induzierten viralen Hepatitis (Kap. 3.4.8) zeigte sich, dass XIM den Leberschaden innerhalb weniger Stunden stark ansteigen ließ und in einer Mortalität von 50-75% resultierte. TNF spielt folglich im Modell der XIM-DILI eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung der Hepatotoxizität.

Da nur wenige *in vivo* Modelle für iDILI existieren, ist über die zugrunde liegenden Mechanismen bisher relativ wenig bekannt. Im DILI-Modell des Poly I:C/Halothan-induzierten Leberschaden übt TNF ebenfalls eine zentrale Rolle aus. Die Depletion von TNF durch anti-Maus TNF cV1q Antikörper resultiert in einer signifikanten Reduktion der Hepatotoxizität (Cheng et al., 2009a). Bei der Koadministration von LPS mit verschiedenen iDILI-assoziierten Medikamenten scheint TNF ebenfalls an der Leberschädigung beteiligt zu sein. Anstelle von LPS kann TVX auch mit TNF verabreicht werden und übt eine ähnlich stark schädigende Wirkung auf die Leber aus wie LPS (Shaw et al., 2009c). Bei XIM allerdings reicht die alleinige Koadministration von TNF nicht aus, um einen Leberschaden zu induzieren (siehe Kap. 4.8, Abb. 13a und Abb. 14). Eine Virusinfektion der Leber, sowie das Vorhandensein des TNF-Rezeptor Signalwegs ist für die Generation des Leberschadens durch XIM notwendig.

Beim dem am besten untersuchten DILI Modell, der Paracetamol-induzierten Hepatotoxizität wird die Rolle von TNF kontrovers diskutiert. Während Blazka et al. zeigen, dass das Serumlevel von TNF durch Paracetamol in Mäusen stark erhöht wird und durch anti-TNF Antikörper die Leberschädigung partiell verhindert werden kann (Blazka et al., 1995, 1996), zeigen andere Studien, dass TNF keinen Einfluss auf die Toxizität von Paracetamol

hat: Wt-Mäuse, TNF-R1<sup>-/-</sup> Mäuse und TNF<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen eine vergleichbare Sensitivität Paracetamol gegenüber und die Behandlung mit anti-TNF Antikörper oder löslichem TNF-Rezeptor beeinflusst die Toxizität nicht (Boess et al., 1998; James et al., 2005; Simpson et al., 2000).

## **5.6 XIM verstärkt die Apoptose in Leberzellen von Virus-infizierten Mäusen nach TNF-Stimulus**

XIM bewirkte bereits wenige Minuten nach TNF eine verstärkte Aktivierung von ausführenden Caspasen in Virus-infizierten Mäusen. Dabei war der Mechanismus unabhängig vom Virustyp, da sowohl LCMV als auch Adenovirus zu einer gesteigerten Caspase 9 und Caspase 3/7 Aktivierung, und somit zu einer verstärkten Apoptose führten. Durch Inhibition der Apoptose durch einen pan-Caspaseinhibitor oder Fruktose konnte der Leberschaden und die Mortalität der XIM-Mäuse auf das Niveau der Kontrollen reduziert werden.

Da die hepatische Apoptose durch den intrazellulären Energiestatus und den Redoxstatus der Hepatozyten kontrolliert wird, kann durch Fruktose-induzierte Depletion von intrazellulären ATP Speichern der TNF-assoziierte Leberschaden blockiert werden (Latta et al., 2000). Dies und die direkte Blockierung der Apoptose durch Caspaseinhibitoren zeigt, dass Nekrose als Zelltodmechanismus aufgeschossen werden kann.

Der DILI zugrunde liegende molekulare Mechanismus ist für die meisten Medikamente bislang weitgehend unbekannt (Devarbhavi, 2012). Beim am besten untersuchten Modell für DILI, der Paracetamol-induzierten Leberschädigung spielt der Zelltod durch Apoptose eine wichtige Rolle. So kommt es durch das Arzneimittel in Hepatozyten-ähnlichen Zelllinien, primären Hepatozyten und LSEC zur Verstärkung des TRAIL Signalwegs und dadurch zu einer verstärkten Leberschädigung durch Apoptose. Wie bei XIM auch, kann der Zelltod durch Inhibition von Caspasen effizient vermindert werden (Badmann et al., 2012). Die Bedeutung der Apoptose zeigt sich zudem darin, dass TRAIL oder Bim-defiziente Mäuse vor der Paracetamol-induzierten Leberschädigung protektiert sind (Badmann et al., 2011).

Die Inhibition der Apoptose entwickelt sich bei der Entwicklung von Arzneimitteln gegen DILI zudem zu einer neuen Strategie. Die anti-apoptotischen Eigenschaften von Inhibitoren von Apoptoseproteinen (IAP) oder Bcl-2 Proteinen, sowie Caspase Inhibitoren machen sie in der klinischen Behandlung von DILI potentiell nutzbar (Ghavami et al., 2005). So zeigte die Behandlung von DILI-Patienten mit UDCA (Ursodesoxycholsäure) eine anti-apoptotische Wirkung durch Modulation der MPT, und führte zu einer schnelleren Reduktion von Bilirubin und Transaminasen nach DILI (Wree et al., 2011).

Neue Marker für Apoptose, die eine höhere Sensitivität aufweisen wie beispielsweise das Neoantigen Cytokeratin-18 oder miRNA 122 könnten zudem hilfreich bei der frühen Diagnose von DILI sein (Roth et al., 2004; Ruoquan et al., 2013).

## **5.7 ER-Stress ist nicht in XIM-DILI involviert**

Durch XIM wird die Proteinexpression der ER-Stress Marker CHOP und CRP78 nicht induziert und auch die Virusinfektion durch LCMV oder Adenovirus verändert die Expression der ER-Stress Marker nicht. Auch die Kobehandlung der Mäuse mit XIM und Virus induziert keinen ER-Stress. Anders als für die Medikamente Diclofenac, Efavirenz, Furosemid, Indomethacin, Sertralin, Troglitazon und Paracetamol, dessen leberschädigende Wirkung mit ER-Stress verknüpft ist (Foufelle and Fromenty, 2016), führt XIM oder Virusinfektion nicht zu ER-Stress und dieser trägt folglich nicht zur Pathogenese des XIM-vermittelten viralen Leberschaden bei. In Hepatozyten sind Mitochondrien zentraler Bestandteil der Apoptose. Daher wurde der Einfluss von XIM auf Mitochondrien von Adenovirus-infizierten Mäusen ermittelt, welche entweder für kurze Zeit *ex vivo* oder für mehrere Tage *in vivo* XIM ausgesetzt waren.

## 5.8 Schädigung von Mitochondrien durch XIM in virusinfizierten Leberzellen

In Hepatozyten sind Mitochondrien das zentrale Element der Apoptose. Werden Mitochondrien hohen Calciumkonzentrationen ausgesetzt, kommt es zur Steigerung des Membranpotentials und in der Folge zur Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung und zur Schwellung der Mitochondrien. Durch oxidativen Stress wird die Öffnung dieser sogenannten mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP) verstärkt (Halestrap et al., 1997), und vermehrt proapoptotische Proteine in das Cytoplasma freigesetzt. Für viele Medikamente ist beschrieben, dass sie oxidativen Stress hervorrufen können, der in einer Schädigung der Mitochondrien resultiert (Pessayre et al., 2010). XIM wird in der äußeren mitochondrialen Membran von Hepatozyten zu mitotoxischen Metaboliten verstoffwechselt, wobei oxidativer Stress ausgelöst und die mitochondriale Atmung verringert wird (Neve et al., 2015).

Während die kurzzeitige *ex vivo* Behandlung mit XIM keinen Einfluss auf Sensitivität der Mitochondrien gegenüber dem Stress-Stimulus Calcium hatte, zeigte die längere *in vivo* Exposition einen deutlichen Effekt auf die Öffnung der mPTP: Nach mehrtägiger *in vivo* Verabreichung von XIM verloren hepatische Mitochondrien von Adenovirus-infizierten Mäusen ihr Membranpotential schneller als Mitochondrien von Kontrolltieren. Simultan dazu verlief das Anschwellen hepatischer XIM-behandelter Mitochondrien aus Virus-infizierten Mäusen nach Calcium-Stimulus schneller. Die Tatsache, dass XIM erst nach mehrtägiger Verabreichung eine mitotoxische Wirkung durch verstärkte Öffnung der mPTP zeigte, denkt sich mit Beobachtungen bei anderen Medikamenten. Eine Vielzahl von Arzneimitteln, die mit einer ideosynkratischen Leberschädigung assoziiert sind, rufen diese mit einer Latenz von einem Monat bis zu einem Jahr hervor (Kaplowitz, 2001).

XIM induzierte alleinig in Leberzellen von Virus-infizierten Mäusen eine verstärkte Öffnung der mPTP, während XIM auf hepatische Mitochondrien nicht-infizierter Mäuse keinen toxischen Effekt hatte. Auch für den Menschen ist bekannt, dass die Kombination einer hepatotropen Virusinfektion mit einem Medikament ein Risikofaktor für die Entwicklung von DILI sein kann. HIV-1 Protease Inhibitoren sind essentielle Komponenten der antiretroviralen Therapie. Allerdings stellt mitochondriale Toxizität ein ernsthaftes

Problem für Patienten, die diese Arzneimittel einnehmen dar. So erhöht die Koinfektion mit HBV, HCV oder HBV/HCV bei HIV-Patienten das Risiko für die mitochondriale Toxizität von HIV-1 Protease Inhibitoren und führt zur einer Leberschädigung (Bonacini, 2004; den Brinker et al., 2000; Kim et al., 2016). Auch bei der Entwicklung des Reye-Syndroms ist die Kombination einer viralen Infektion mit der gleichzeitigen Einnahme eines Medikamentes – in diesem Fall von Aspirin – für die Schädigung der Mitochondrien entscheidend (Grattagliano et al., 2009). Aspirin kann Hepatotoxizität induzieren, welche sich mechanistisch von der Toxizität anderer nicht-steroidaler Antirheumatika unterscheidet. Das Medikament übt einen negativen Effekt auf die mitochondriale Beta-Oxidation aus, welche durch eine parallel ablaufend virale Infektionen, die ihrerseits die mitochondriale Funktion beeinflusst, verstärkt wird (Fromenty and Pessayre, 1995). Diese Kombination kann bei Kindern in einer mikrovesikulären Steatosis der Leber und einer Enzephalopathie des Gehirns resultieren (Belay et al., 1999). Aufgrund dessen ist die Verwendung von Aspirin bei Kindern mit fieberhaften Erkrankungen laut Fachinformation kontraindiziert. Wie XIM verursachen auch Antibiotika eine mitochondriale Dysfunktion und eine vermehrte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies in Säugetierzellen (Kalghatgi et al., 2013). Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der Schädigung der Mitochondrien und der Tatsache, dass Antibiotika zu der Medikamentenklasse gehören, die mit 46 % am häufigsten iDILI hervorruft (Chalasani et al., 2008; Reuben et al., 2010). Durch das Antioxidans Acetylcystein kann der Antibiotika- oder Paracetamol-induzierte oxidative Stress reduziert werden (James et al., 2003b; Kalghatgi et al., 2013; Saito et al., 2010). Da auch XIM *in vitro* zu oxidativem Stress führt (Neve et al., 2015), könnte die Behandlung mit Acetylcytein einen protektiven Effekt im XIM-DILI Modell für Leberschaden haben.

Die Öffnung der MPT Pore kann durch Cyclosporin A blockiert werden (Halestrap et al., 1997). Folglich könnte die Verabreichung des Inhibitors die vermehrte Öffnung der mPTP bei hepatischen Mitochondrien von XIM/Virus Mäusen im XIM-DILI Modell verhindern und die Mäuse somit vor Leberschaden und Mortalität schützen.

Der als Kontrolle verwendete Thrombininhibitor DAB zeigte keine verstärkende Wirkung auf die TNF-induzierte virale Hepatitis. DAB wird von unspezifischen ubiquitären Esterasen im Darm, Plasma und Leber zu Dabigatran verstoffwechselt (Hankey and Eikelboom,

2011). Die Metabolisierung geschieht dabei nicht wie bei XIM über mARC2 in der äußeren mitochondrialen Membran. Dies könnte erklären, warum DAB im Gegensatz zu XIM nicht hepatotoxisch ist. XIM wird als Prodrug verabreicht und zu MEL, dem aktive Bestandteil, metabolisiert. Da MEL im XIM-DILI Modell keinen Leberschaden hervorgerufen hat, liegt die Vermutung nahe, dass die bei der Metabolisierung von XIM entstehenden mitotoxischen Metabolite (Neve et al., 2015) ausschlaggebend für die Öffnung der mPTP und die daraus resultierende verstärkte Apoptose sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass XIM alleinig auf hepatische Mitochondrien virusinfizierter Mäusen einen Einfluss auf die Öffnung mPTP ausübt, wohingegen Mitochondrien aus Kontrollmäusen nicht von XIM geschädigt wurden. Dieser Effekt trat erst auf, nachdem die Mäuse XIM für einige Tage ausgesetzt waren, die kurzzeitige *ex vivo* Behandlung mit der Substanz zeigte keine Auswirkungen. Dies deckt sich mit den Untersuchungen zur Leberschädigung und zum Überleben der Mäuse. Erst nach mehrtägiger XIM-Verabreichung treten verstärkte Leberschädigung und Mortalität der Mäuse auf und auch erst nach längere XIM-Verabreichung wurden die Mitochondrien geschädigt.

## 5.9 Schlussfolgerung

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit einen bisher unbekanntem Mechanismus der Leberschädigung durch XIM. Dabei spielen virale Infektionen und durch TNF ausgelöste Signalprozesse eine entscheidende Rolle. Das Zusammenspiel von hepatischer Virusinfektionen und das TNF-Rezeptor Signaling in Hepatozyten in Kombination mit der XIM-Exposition führt in Mäusen zur Entwicklung eines ausgeprägten Leberschadens welcher in einer hohen Mortalität resultiert. Dabei sind beide Faktoren – Virusinfektion und TNF – notwendig, um die Hepatotoxizität von XIM auszulösen.

Die vom Virus hervorgerufene Zellschädigung ist dabei unabhängig vom verwendeten Virustyp (RNA-Virus oder DNA-Virus) und führt zu einer Sensitivierung der Hepatozyten. Als zentraler Mediator der Schädigung fungiert im Anschluss das pro-inflammatorische Zytokin TNF. Zudem sind Mitochondrien in Lebern XIM/Virus-kobehandelter Mäuse massiv geschädigt, da sie nach Stimulation mit dem Stress-Stimulus Calcium ihr Membranpo-

tential schneller verlieren. Die daraus resultierende Aktivierung der ausführenden Caspasen ist nur in kobehandelten Tieren verstärkt und die Apoptoserate lässt sich durch Depletion von ATP oder durch Caspase-Inhibitoren weitestgehend normalisieren. Dies ist das erste Tiermodell, das die Untersuchung von Hepatotoxizität, ausgelöst durch die Kombination von Virusinfektion, TNF und dem DILI-assoziierten Medikament XIM, ermöglicht. Der Mechanismus hinter der hepatotoxischen Wirkung kann somit erstmals *in vivo* auf molekularer Ebene untersucht werden. Dieses Modell zeigt, dass virale Infektion möglicherweise als Trigger für DILI fungieren und die Schädigung durch das proinflammatorische Zytokin TNF vermittelt wird.

## LITERATURVERZEICHNIS

Abdelmalek, M.F., Lazo, M., Horska, A., Bonekamp, S., Lipkin, E.W., Balasubramanyam, A., Bantle, J.P., Johnson, R.J., Diehl, A.M., Clark, J.M., et al. (2012). Higher dietary fructose is associated with impaired hepatic adenosine triphosphate homeostasis in obese individuals with type 2 diabetes. *Hepatology*. Baltimore, Md 56, 952–960.

Aggarwal, B.B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 745–756.

Agnelli, G., Eriksson, B.I., Cohen, A.T., Bergqvist, D., Dahl, O.E., Lassen, M.R., Mouret, P., Rosencher, N., Andersson, M., Bylock, A., et al. (2009). Safety assessment of new anti-thrombotic agents: lessons from the EXTEND study on ximelagatran. *Thromb. Res.* 123, 488–497.

Ainscow, E.K., Pilling, J.E., Brown, N.M., Orme, A.T., Sullivan, M., Hargreaves, A.C., Cooke, E.-L., Sullivan, E., Carlsson, S., and Andersson, T.B. (2008a). Investigations into the liver effects of ximelagatran using high content screening of primary human hepatocyte cultures. *Expert Opin. Drug Saf.* 7, 351–365.

Ainscow, E.K., Pilling, J.E., Brown, N.M., Orme, A.T., Sullivan, M., Hargreaves, A.C., Cooke, E.-L., Sullivan, E., Carlsson, S., and Andersson, T.B. (2008b). Investigations into the liver effects of ximelagatran using high content screening of primary human hepatocyte cultures. *Expert Opin. Drug Saf.* 7, 351–365.

Akerman, P., Cote, P., Yang, S.Q., McClain, C., Nelson, S., Bagby, G.J., and Diehl, A.M. (1992). Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. *Am. J. Physiol.* 263, G579-585.

Albers, G.W., Diener, H.-C., Frison, L., Grind, M., Nevinson, M., Partridge, S., Halperin, J.L., Horrow, J., Olsson, S.B., Petersen, P., et al. (2005). Ximelagatran vs warfarin for stroke prevention in patients with nonvalvular atrial fibrillation: a randomized trial. *JAMA* 293, 690–698.

Albert Bendelac, Miguel N. Rivera, Se-Ho Park, and Roark, and J.H. (1997). MOUSE CD1-SPECIFIC NK1 T CELLS: Development, Specificity, and Function. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 535–562.

Andersen, M.H., Schrama, D., Thor Straten, P., and Becker, J.C. (2006). Cytotoxic T cells. *J. Invest. Dermatol.* 126, 32–41.

Andersson, S., Hofmann, Y., Nordling, A., Li, X., Nivelius, S., Andersson, T.B., Ingelman-Sundberg, M., and Johansson, I. (2005). Characterization and partial purification of the rat and human enzyme systems active in the reduction of N-hydroxymelagatran and benzamidoxime. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 33, 570–578.

Andrade, R.J., Lucena, M.I., Fernández, M.C., Pelaez, G., Pachkoria, K., García-Ruiz, E., García-Muñoz, B., González-Grande, R., Pizarro, A., Durán, J.A., et al. (2005). Drug-induced liver injury: an analysis of 461 incidences submitted to the Spanish registry over a 10-year period. *Gastroenterology* 129, 512–521.

Assarsson, E., Kambayashi, T., Sandberg, J.K., Hong, S., Taniguchi, M., Van Kaer, L., Ljunggren, H.G., and Chambers, B.J. (2000). CD8+ T cells rapidly acquire NK1.1 and NK cell-associated molecules upon stimulation in vitro and in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 165, 3673–3679.

Badmann, A., Keough, A., Kaufmann, T., Bouillet, P., Brunner, T., and Corazza, N. (2011). Role of TRAIL and the pro-apoptotic Bcl-2 homolog Bim in acetaminophen-induced liver damage. *Cell Death Dis.* 2, e171.

Badmann, A., Langsch, S., Keogh, A., Brunner, T., Kaufmann, T., and Corazza, N. (2012). TRAIL enhances paracetamol-induced liver sinusoidal endothelial cell death in a Bim- and Bid-dependent manner. *Cell Death Dis.* 3, e447.

Bajt, M.L., Cover, C., Lemasters, J.J., and Jaeschke, H. (2006). Nuclear Translocation of Endonuclease G and Apoptosis-Inducing Factor during Acetaminophen-Induced Liver Cell Injury. *Toxicol. Sci.* 94, 217–225.

Baud, V., and Karin, M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.* 11, 372–377.

Belay, E.D., Bresee, J.S., Holman, R.C., Khan, A.S., Shahriari, A., and Schonberger, L.B. (1999). Reye's syndrome in the United States from 1981 through 1997. *N. Engl. J. Med.* 340, 1377–1382.

Bertolino, P., Trescol-Biémont, M.C., and Roubourdin-Combe, C. (1998). Hepatocytes induce functional activation of naive CD8+ T lymphocytes but fail to promote survival. *Eur. J. Immunol.* 28, 221–236.

Bertolino, P., Bowen, D.G., McCaughan, G.W., and Groth, B.F. de S. (2001). Antigen-Specific Primary Activation of CD8+ T Cells Within the Liver. *J. Immunol.* 166, 5430–5438.

Biburger, M., and Tiegs, G. (2005). Alpha-galactosylceramide-induced liver injury in mice is mediated by TNF-alpha but independent of Kupffer cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 175, 1540–1550.

Björnsson, E.S., Bergmann, O.M., Björnsson, H.K., Kvaran, R.B., and Olafsson, S. (2013). Incidence, Presentation, and Outcomes in Patients With Drug-Induced Liver Injury in the General Population of Iceland. *Gastroenterology* 144, 1419–1425.e3.

Blazka, M.E., Wilmer, J.L., Holladay, S.D., Wilson, R.E., and Luster, M.I. (1995). Role of pro-inflammatory cytokines in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 133, 43–52.

- Blazka, M.E., Elwell, M.R., Holladay, S.D., Wilson, R.E., and Luster, M.I. (1996). Histopathology of acetaminophen-induced liver changes: role of interleukin 1 alpha and tumor necrosis factor alpha. *Toxicol. Pathol.* *24*, 181–189.
- Blech, S., Ebner, T., Ludwig-Schwellinger, E., Stangier, J., and Roth, W. (2008). The metabolism and disposition of the oral direct thrombin inhibitor, dabigatran, in humans. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* *36*, 386–399.
- Blouin, A., Bolender, R.P., and Weibel, E.R. (1977). Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *J. Cell Biol.* *72*, 441–455.
- Boess, F., Bopst, M., Althaus, R., Polsky, S., Cohen, S.D., Eugster, H.P., and Boelsterli, U.A. (1998). Acetaminophen hepatotoxicity in tumor necrosis factor/lymphotoxin-alpha gene knockout mice. *Hepatology* *27*, 1021–1029.
- Bonacini, M. (2004). Liver injury during highly active antiretroviral therapy: the effect of hepatitis C coinfection. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *38 Suppl 2*, S104–108.
- Bots, M., and Medema, J.P. (2006). Granzymes at a glance. *J. Cell Sci.* *119*, 5011–5014.
- Braun, M.Y., Lowin, B., French, L., Acha-Orbea, H., and Tschopp, J. (1996). Cytotoxic T cells deficient in both functional fas ligand and perforin show residual cytolytic activity yet lose their capacity to induce lethal acute graft-versus-host disease. *J. Exp. Med.* *183*, 657–661.
- Brighton, T.A. (2004). The direct thrombin inhibitor melagatran/ximelagatran. *Med. J. Aust.* *181*.
- den Brinker, M., Wit, F.W., Wertheim-van Dillen, P.M., Jurriaans, S., Weel, J., van Leeuwen, R., Pakker, N.G., Reiss, P., Danner, S.A., Weverling, G.J., et al. (2000). Hepatitis B and C virus co-infection and the risk for hepatotoxicity of highly active antiretroviral therapy in HIV-1 infection. *AIDS Lond. Engl.* *14*, 2895–2902.
- Buchweitz, J.P., Ganey, P.E., Bursian, S.J., and Roth, R.A. (2002). Underlying Endotoxemia Augments Toxic Responses to Chlorpromazine: Is There a Relationship to Drug Idiosyncrasy? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *300*, 460–467.
- Caldeira, D., Barra, M., Santos, A.T., de Abreu, D., Pinto, F.J., Ferreira, J.J., and Costa, J. (2014). Risk of drug-induced liver injury with the new oral anticoagulants: systematic review and meta-analysis. *Heart Br. Card. Soc.* *100*, 550–556.
- Calne, R.Y., Sells, R.A., Pena, J.R., Davis, D.R., Millard, P.R., Herbertson, B.M., Binns, R.M., and Davies, D.A. (1969). Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature* *223*, 472–476.
- Canbay, A., Taimr, P., Torok, N., Higuchi, H., Friedman, S., and Gores, G.J. (2003b).

Apoptotic Body Engulfment by a Human Stellate Cell Line Is Profibrogenic. *Lab. Invest.* **83**, 655–663.

Canbay, A., Feldstein, A.E., Higuchi, H., Werneburg, N., Grambihler, A., Bronk, S.F., and Gores, G.J. (2003a). Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. *Hepatology* **38**, 1188–1198.

Canbay, A., Feldstein, A., Baskin-Bey, E., Bronk, S.F., and Gores, G.J. (2004). The caspase inhibitor IDN-6556 attenuates hepatic injury and fibrosis in the bile duct ligated mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **308**, 1191–1196.

Cantor, H.M., and Dumont, A.E. (1967). Hepatic suppression of sensitization to antigen absorbed into the portal system. *Nature* **215**, 744–745.

Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 3666–3670.

CHALASANI, N., and BJÖRNSSON, E. (2010). Risk Factors for Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury. *Gastroenterology* **138**, 2246–2259.

Chalasani, N., Fontana, R.J., Bonkovsky, H.L., Watkins, P.B., Davern, T., Serrano, J., Yang, H., Rochon, J., and Drug Induced Liver Injury Network (DILIN) (2008). Causes, clinical features, and outcomes from a prospective study of drug-induced liver injury in the United States. *Gastroenterology* **135**, 1924–1934, 1934-4.

Chen, H.J.L., Bloch, K.J., and Maclean, J.A. (2000). Acute Eosinophilic Hepatitis from Trovafloxacin. *N. Engl. J. Med.* **342**, 359–360.

Cheng, L., You, Q., Yin, H., Holt, M., Franklin, C., and Ju, C. (2009a). Effect of Polyl:C Co-treatment on Halothane-Induced Liver Injury in Mice. *Hepatology* **49**, 215–226.

Cheng, L., You, Q., Yin, H., Holt, M., Franklin, C., and Ju, C. (2009b). Effect of polyl:C cotreatment on halothane-induced liver injury in mice. *Hepatology* **49**, 215–226.

Cheng, L., You, Q., Yin, H., Holt, M.P., and Ju, C. (2010). Involvement of natural killer T cells in halothane-induced liver injury in mice. *Biochem. Pharmacol.* **80**, 255–261.

Chirmule, N., Moscioni, A.D., Qian, Y., Qian, R., Chen, Y., and Wilson, J.M. (1999). Fas-Fas Ligand Interactions Play a Major Role in Effector Functions of Cytotoxic T Lymphocytes after Adenovirus Vector-Mediated Gene Transfer. *Hum. Gene Ther.* **10**, 259–269.

Cover, C., Mansouri, A., Knight, T.R., Bajt, M.L., Lemasters, J.J., Pessayre, D., and Jaeschke, H. (2005). Peroxynitrite-induced mitochondrial and endonuclease-mediated nuclear DNA damage in acetaminophen hepatotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **315**, 879–887.

Crispe, I.N. (2003). Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 51–62.

- Crispe, I.N. (2009). The liver as a lymphoid organ. *Annu. Rev. Immunol.* *27*, 147–163.
- Crocetti, D., Palmieri, A., Pedullà, G., Pasta, V., D’Orazi, V., and Grazi, G.L. (2015). Peliosis hepatitis: Personal experience and literature review. *World J. Gastroenterol.* *21*, 13188–13194.
- Czaja, M.J., Xu, J., and Alt, E. (1995). Prevention of carbon tetrachloride-induced rat liver injury by soluble tumor necrosis factor receptor. *Gastroenterology* *108*, 1849–1854.
- Daussy, C., Faure, F., Mayol, K., Viel, S., Gasteiger, G., Charrier, E., Bienvenu, J., Henry, T., Debien, E., Hasan, U.A., et al. (2014). T-bet and Eomes instruct the development of two distinct natural killer cell lineages in the liver and in the bone marrow. *J. Exp. Med.* *211*, 563–577.
- DeLeve, L.D., Wang, X., Kuhlenkamp, J.F., and Kaplowitz, N. (1996). Toxicity of azathioprine and monocrotaline in murine sinusoidal endothelial cells and hepatocytes: The role of glutathione and relevance to hepatic venoocclusive disease. *Hepatology* *23*, 589–599.
- Deng, X., Stachlewitz, R.F., Liguori, M.J., Blomme, E.A.G., Waring, J.F., Luyendyk, J.P., Maddox, J.F., Ganey, P.E., and Roth, R.A. (2006). Modest Inflammation Enhances Diclofenac Hepatotoxicity in Rats: Role of Neutrophils and Bacterial Translocation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *319*, 1191–1199.
- Deng, X., Luyendyk, J.P., Ganey, P.E., and Roth, R.A. (2009). Inflammatory Stress and Idiosyncratic Hepatotoxicity: Hints from Animal Models. *Pharmacol. Rev.* *61*, 262–282.
- Devarbhavi, H. (2012). An Update on Drug-induced Liver Injury. *J. Clin. Exp. Hepatol.* *2*, 247–259.
- Diehl, A.M., Yin, M., Fleckenstein, J., Yang, S.Q., Lin, H.Z., Brenner, D.A., Westwick, J., Bagby, G., and Nelson, S. (1994). Tumor necrosis factor-alpha induces c-jun during the regenerative response to liver injury. *Am. J. Physiol.* *267*, G552-561.
- Ding, W.-X., and Yin, X.-M. (2004). Dissection of the multiple mechanisms of TNF- $\alpha$ -induced apoptosis in liver injury. *J. Cell. Mol. Med.* *8*, 445–454.
- Doherty, D.G., and O’Farrelly, C. (2000). Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunol. Rev.* *174*, 5–20.
- Doherty, D.G., Norris, S., Madrigal-Estebas, L., McEntee, G., Traynor, O., Hegarty, J.E., and O’Farrelly, C. (1999). The human liver contains multiple populations of NK cells, T cells, and CD3+CD56+ natural T cells with distinct cytotoxic activities and Th1, Th2, and Th0 cytokine secretion patterns. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *163*, 2314–2321.
- Dong, Z., Wei, H., Sun, R., Hu, Z., Gao, B., and Tian, Z. (2004). Involvement of natural killer cells in PolyI:C-induced liver injury. *J. Hepatol.* *41*, 966–973.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M., and Kaufmann, S.H. (1999). Mammalian caspases: struc-

ture, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* *68*, 383–424.

Eeva, J., Nuutinen, U., Ropponen, A., Mättö, M., Eray, M., Pellinen, R., Wahlfors, J., and Pelkonen, J. (2009). The involvement of mitochondria and the caspase-9 activation pathway in rituximab-induced apoptosis in FL cells. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* *14*, 687–698.

Elinav, E., Pappo, O., Sklair-Levy, M., Margalit, M., Shibolet, O., Gomori, M., Alper, R., Thalenfeld, B., Engelhardt, D., Rabbani, E., et al. (2006). Adoptive transfer of regulatory NKT lymphocytes ameliorates non-alcoholic steatohepatitis and glucose intolerance in ob/ob mice and is associated with intrahepatic CD8 trapping. *J. Pathol.* *209*, 121–128.

Elkon, K.B., Liu, C.C., Gall, J.G., Trevejo, J., Marino, M.W., Abrahamsen, K.A., Song, X., Zhou, J.L., Old, L.J., Crystal, R.G., et al. (1997). Tumor necrosis factor alpha plays a central role in immune-mediated clearance of adenoviral vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 9814–9819.

Eriksson, U.G., Bredberg, U., Hoffmann, K.-J., Thuresson, A., Gabrielsson, M., Ericsson, H., Ahnoff, M., Gislén, K., Fager, G., and Gustafsson, D. (2003). Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion of Ximelagatran, an Oral Direct Thrombin Inhibitor, in Rats, Dogs, and Humans. *Drug Metab. Dispos.* *31*, 294–305.

Everhart, J.E., and Ruhl, C.E. (2009). Burden of Digestive Diseases in the United States Part III: Liver, Biliary Tract, and Pancreas. *Gastroenterology* *136*, 1134–1144.

Fiessinger, J.-N., Huisman, M.V., Davidson, B.L., Bounameaux, H., Francis, C.W., Eriksson, H., Lundström, T., Berkowitz, S.D., Nyström, P., Thorsén, M., et al. (2005). Ximelagatran vs low-molecular-weight heparin and warfarin for the treatment of deep vein thrombosis: a randomized trial. *JAMA* *293*, 681–689.

Foufelle, F., and Fromenty, B. (2016). Role of endoplasmic reticulum stress in drug-induced toxicity. *Pharmacol. Res. Perspect.* *4*.

Fromenty, B., and Pessayre, D. (1995). Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol. Ther.* *67*, 101–154.

Fujimoto, K., Kumagai, K., Ito, K., Arakawa, S., Ando, Y., Oda, S., Yamoto, T., and Manabe, S. (2009). Sensitivity of liver injury in heterozygous Sod2 knockout mice treated with troglitazone or acetaminophen. *Toxicol. Pathol.* *37*, 193–200.

Gallegos-Orozco, J.F., and Rakela-Brödner, J. (2010). Hepatitis viruses: not always what it seems to be. *Rev. Médica Chile* *138*, 1302–1311.

Ganey, P.E., Luyendyk, J.P., Maddox, J.F., and Roth, R.A. (2004). Adverse hepatic drug reactions: inflammatory episodes as consequence and contributor. *Chem. Biol. Interact.* *150*, 35–51.

Gao, B., Radaeva, S., and Park, O. (2009). Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases. *J. Leukoc. Biol.* *86*, 513–528.

Getachew, Y., James, L., Lee, W.M., Thiele, D.L., and Miller, B.C. (2010). Susceptibility to acetaminophen (APAP) toxicity unexpectedly is decreased during acute viral hepatitis in mice. *Biochem. Pharmacol.* *79*, 1363–1371.

Ghavami, S., Hashemi, M., Kadkhoda, K., Alavian, S.M., Bay, G.H., and Los, M. (2005). Apoptosis in liver diseases--detection and therapeutic applications. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* *11*, RA337-345.

Giacomello, M., Drago, I., Pizzo, P., and Pozzan, T. (2007). Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> as a key regulator of cell life and death. *Cell Death Differ.* *14*, 1267–1274.

Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* *36*, 59–74.

Grattagliano, I., Bonfrate, L., Diogo, C.V., Wang, H.H., Wang, D.Q., and Portincasa, P. (2009). Biochemical mechanisms in drug-induced liver injury: Certainties and doubts. *World J. Gastroenterol. WJG* *15*, 4865–4876.

Grell, M. (1995). Tumor necrosis factor (TNF) receptors in cellular signaling of soluble and membrane-expressed TNF. *J. Inflamm.* *47*, 8–17.

Gustafsson, D., Nyström, J., Carlsson, S., Bredberg, U., Eriksson, U., Gyzander, E., Elg, M., Antonsson, T., Hoffmann, K., Ungell, A., et al. (2001). The direct thrombin inhibitor melagatran and its oral prodrug H 376/95: intestinal absorption properties, biochemical and pharmacodynamic effects. *Thromb. Res.* *101*, 171–181.

Hadem, J., Tacke, F., Bruns, T., Langgartner, J., Strnad, P., Denk, G.U., Fikatas, P., Manns, M.P., Hofmann, W.P., Gerken, G., et al. (2012). Etiologies and outcomes of acute liver failure in Germany. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* *10*, 664–669.e2.

Halestrap, A.P., Connern, C.P., Griffiths, E.J., and Kerr, P.M. (1997). Cyclosporin A binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury. *Mol. Cell. Biochem.* *174*, 167–172.

Hankey, G.J., and Eikelboom, J.W. (2011). Dabigatran Etexilate A New Oral Thrombin Inhibitor. *Circulation* *123*, 1436–1450.

Hashimoto, W., Takeda, K., Anzai, R., Ogasawara, K., Sakihara, H., Sugiura, K., Seki, S., and Kumagai, K. (1995). Cytotoxic NK1.1 Ag<sup>+</sup> alpha beta T cells with intermediate TCR induced in the liver of mice by IL-12. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *154*, 4333–4340.

He, B. (2006). Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses. *Cell Death Differ.* *13*, 393–403.

Hogaboam, C.M., Bone-Larson, C.L., Steinhauser, M.L., Matsukawa, A., Gosling, J., Boring, L., Charo, I.F., Simpson, K.J., Lukacs, N.W., and Kunkel, S.L. (2000). Exaggerated hepatic injury due to acetaminophen challenge in mice lacking C-C chemokine receptor 2. *Am. J. Pathol.* *156*, 1245–1252.

Holt, M.P., and Ju, C. (2006). Mechanisms of drug-induced liver injury. *AAPS J.* *8*, E48–E54.

Hotamisligil, G.S. (2010). Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* *140*, 900–917.

Irons, E.E., Flatt, J.W., Doronin, K., Fox, T.L., Acchione, M., Stewart, P.L., and Shayakhmetov, D.M. (2013). Coagulation Factor Binding Orientation and Dimerization May Influence Infectivity of Adenovirus-Coagulation Factor Complexes. *J. Virol.* *87*, 9610–9619.

Jaeschke, H. (1990). Glutathione disulfide formation and oxidant stress during acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice in vivo: the protective effect of allopurinol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *255*, 935–941.

Jaeschke, H., Xie, Y., and McGill, M.R. (2014). Acetaminophen-induced Liver Injury: from Animal Models to Humans. *J. Clin. Transl. Hepatol.* *2*, 153–161.

James, L.P., Mayeux, P.R., and Hinson, J.A. (2003a). Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity. *Drug Metab. Dispos.* *31*, 1499–1506.

James, L.P., McCullough, S.S., Lamps, L.W., and Hinson, J.A. (2003b). Effect of N-Acetylcysteine on Acetaminophen Toxicity in Mice: Relationship to Reactive Nitrogen and Cytokine Formation. *Toxicol. Sci.* *75*, 458–467.

James, L.P., Kurten, R.C., Lamps, L.W., McCullough, S., and Hinson, J.A. (2005). Tumour necrosis factor receptor 1 and hepatocyte regeneration in acetaminophen toxicity: a kinetic study of proliferating cell nuclear antigen and cytokine expression. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* *97*, 8–14.

Jiang, J.X., Mikami, K., Venugopal, S., Li, Y., and Török, N.J. (2009). Apoptotic body engulfment by hepatic stellate cells promotes their survival by the JAK/STAT and Akt/NF- $\kappa$ B-dependent pathways. *J. Hepatol.* *51*, 139–148.

Jin, Y.-Y., Yu, X.-N., Qu, Z.-Y., Zhang, A.-A., Xing, Y.-L., Jiang, L.-X., Shang, L., and Wang, Y.-C. (2014). Adenovirus type 3 induces platelet activation in vitro. *Mol. Med. Rep.* *9*, 370–374.

Johansson, S., Cullberg, M., Eriksson, U.G., Elg, M., Dunér, K., Jensen, E., Wollbratt, M., and Wåhlander, K. (2011). Single-dose pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of AZD0837, a novel oral direct thrombin inhibitor, in young healthy male subjects. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* *49*, 258–267.

Jonsson-Schmunk, K., Wonganan, P., Choi, J.H., Callahan, S.M., and Croyle, M.A. (2016).

Integrin Receptors Play a Key Role in the Regulation of Hepatic Cytochrome P450 3A. *Drug Metab. Dispos.* dmd.115.068874.

Kafrouni, M.I., Brown, G.R., and Thiele, D.L. (2001). Virally infected hepatocytes are resistant to perforin-dependent CTL effector mechanisms. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 1566–1574.

Kalabis, G.M., and Wells, P.G. (1990). Biphasic modulation of acetaminophen bioactivation and hepatotoxicity by pretreatment with the interferon inducer polyinosinic-polycytidylic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255, 1408–1419.

Kalghatgi, S., Spina, C.S., Costello, J.C., Liesa, M., Morones-Ramirez, J.R., Slomovic, S., Molina, A., Shirihai, O.S., and Collins, J.J. (2013). Bactericidal Antibiotics Induce Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Damage in Mammalian Cells. *Sci. Transl. Med.* 5, 192ra85-192ra85.

Kambayashi, T., Assarsson, E., Michaëlsson, J., Berglund, P., Diehl, A.D., Chambers, B.J., and Ljunggren, H.-G. (2000). Emergence of CD8+ T Cells Expressing NK Cell Receptors in Influenza A Virus-Infected Mice. *J. Immunol.* 165, 4964–4969.

Kaplan, K.L. (2003). Direct thrombin inhibitors. *Expert Opin. Pharmacother.* 4, 653–666.

Kaplowitz, D.N. (2012). Drug-Induced Liver Disorders. *Drug Saf.* 24, 483–490.

Kaplowitz, N. (2001). Drug-induced liver disorders: implications for drug development and regulation. *Drug Saf.* 24, 483–490.

Kaplowitz, N. (2002). Biochemical and cellular mechanisms of toxic liver injury. *Semin. Liver Dis.* 22, 137–144.

Kaplowitz, N. (2004). Drug-induced liver injury. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 38 Suppl 2, S44-48.

Kassel, K.M., Sullivan, B.P., Cui, W., Copple, B.L., and Luyendyk, J.P. (2012). Therapeutic administration of the direct thrombin inhibitor argatroban reduces hepatic inflammation in mice with established fatty liver disease. *Am. J. Pathol.* 181, 1287–1295.

Keisu, M., and Andersson, T.B. (2010). Drug-Induced Liver Injury in Humans: The Case of Ximelagatran. In *Adverse Drug Reactions*, J. Uetrecht, ed. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 407–418.

Kenne, K., Skanberg, I., Glinghammar, B., Berson, A., Pessayre, D., Flinois, J.-P., Beaune, P., Edebert, I., Pohl, C.D., Carlsson, S., et al. (2008). Prediction of drug-induced liver injury in humans by using in vitro methods: The case of ximelagatran. *Toxicol. In Vitro* 22, 730–746.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257.

Kim, W.R. (2009). Epidemiology of Hepatitis B in the United States. *Hepatology*. Baltimore, Md 49, S28–S34.

Kim, W.S., Lee, S.S., Lee, C.M., Kim, H.J., Ha, C.Y., Kim, H.J., Kim, T.H., Jung, W.T., Lee, O.J., Hong, J.W., et al. (2016). Hepatitis C and not Hepatitis B virus is a risk factor for anti-tuberculosis drug induced liver injury. *BMC Infect. Dis.* 16, 50.

Kindmark, A., Jawaid, A., Harbron, C.G., Barratt, B.J., Bengtsson, O.F., Andersson, T.B., Carlsson, S., Cederbrant, K.E., Gibson, N.J., Armstrong, M., et al. (2008). Genome-wide pharmacogenetic investigation of a hepatic adverse event without clinical signs of immunopathology suggests an underlying immune pathogenesis. *Pharmacogenomics J.* 8, 186–195.

Knight, T.R., Ho, Y.-S., Farhood, A., and Jaeschke, H. (2002). Peroxynitrite is a critical mediator of acetaminophen hepatotoxicity in murine livers: protection by glutathione. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303, 468–475.

Knolle, P.A., and Gerken, G. (2000). Local control of the immune response in the liver. *Immunol. Rev.* 174, 21–34.

Knolle, P.A., and Limmer, A. (2001). Neighborhood politics: the immunoregulatory function of organ-resident liver endothelial cells. *Trends Immunol.* 22, 432–437.

Kon, K., Kim, J.-S., Jaeschke, H., and Lemasters, J.J. (2004). Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes. *Hepatology*. Baltimore, Md 40, 1170–1179.

Kon, K., Kim, J.-S., Uchiyama, A., Jaeschke, H., and Lemasters, J.J. (2010). Lysosomal iron mobilization and induction of the mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced toxicity to mouse hepatocytes. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 117, 101–108.

Kopec, A.K., Joshi, N., Towery, K.L., Kassel, K.M., Sullivan, B.P., Flick, M.J., and Luyendyk, J.P. (2014). Thrombin inhibition with dabigatran protects against high-fat diet-induced fatty liver disease in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 351, 288–297.

Korsmeyer, S.J., Wei, M.C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K.J., and Schlesinger, P.H. (2000). Proapoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ.* 7, 1166–1173.

Krawitt, E.L. (2006). Autoimmune hepatitis. *N. Engl. J. Med.* 354, 54–66.

Krompholz, N., Krischkowski, C., Reichmann, D., Garbe-Schönberg, D., Mendel, R.-R., Bittner, F., Clement, B., and Havemeyer, A. (2012). The mitochondrial Amidoxime Reducing Component (mARC) is involved in detoxification of N-hydroxylated base analogues. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 2443–2450.

Kuniholm, M.H., Purcell, R.H., McQuillan, G.M., Engle, R.E., Wasley, A., and Nelson, K.E.

(2009). Epidemiology of hepatitis E virus in the United States: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *J. Infect. Dis.* *200*, 48–56.

Kuwana, T., Mackey, M.R., Perkins, G., Ellisman, M.H., Latterich, M., Schneiter, R., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (2002). Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* *111*, 331–342.

Lalazar, G., and Ilan, Y. (2014). Viral Diseases of the Liver. In *Liver Immunology*, M.E. Gershwin, J.M. Vierling, and M.P. Manns, eds. (Springer International Publishing), pp. 159–171.

Lanier, L.L., Phillips, J.H., Hackett, J., Tutt, M., and Kumar, V. (1986). Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J. Immunol. Baltim. Md* *137*, 2735–2739.

Latta, M., Künstle, G., Leist, M., and Wendel, A. (2000). Metabolic Depletion of Atp by Fructose Inversely Controls Cd95- and Tumor Necrosis Factor Receptor 1-Mediated Hepatic Apoptosis. *J. Exp. Med.* *191*, 1975–1986.

Lazarczyk, D.A., Goldstein, N.S., and Gordon, S.C. (2001). CASE REPORT: Trovafloxacin Hepatotoxicity. *Dig. Dis. Sci.* *46*, 925–926.

Lee, W.M., Larrey, D., Olsson, R., Lewis, J.H., Keisu, M., Auclert, L., and Sheth, S. (2005). Hepatic findings in long-term clinical trials of ximelagatran. *Drug Saf.* *28*, 351–370.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* *91*, 479–489.

Li, Z., Oben, J.A., Yang, S., Lin, H., Stafford, E.A., Soloski, M.J., Thomas, S.A., and Diehl, A.M. (2004). Norepinephrine regulates hepatic innate immune system in leptin-deficient mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. *Baltim. Md* *40*, 434–441.

Limmer, A., Sacher, T., Alferink, J., Kretschmar, M., Schönrich, G., Nichterlein, T., Arnold, B., and Hämmerling, G.J. (1998). Failure to induce organ-specific autoimmunity by breaking of tolerance: importance of the microenvironment. *Eur. J. Immunol.* *28*, 2395–2406.

Lip, G.Y.H., Rasmussen, L.H., Olsson, S.B., Jensen, E.C., Persson, A.L., Eriksson, U., and Wåhlander, K.F.C. (2009). Oral direct thrombin inhibitor AZD0837 for the prevention of stroke and systemic embolism in patients with non-valvular atrial fibrillation: a randomized dose-guiding, safety, and tolerability study of four doses of AZD0837 vs. vitamin K antagonists. *Eur. Heart J.* *30*, 2897–2907.

Lip, G.Y.H., Rasmussen, L.H., Olsson, S.B., Zetterstrand, S., Stahre, C., Bylock, A., Aunes-Jansson, M., Eriksson, U., Wåhlander, K., and Steering Committee (2011). Oral direct thrombin inhibitor AZD0837 for the prevention of stroke and systemic embolism in patients with non-valvular atrial fibrillation: a Phase II study of AZD0837 in patients who are appropriate for but unable or unwilling to take vitamin K antagonist therapy. *Thromb.*

Res. 127, 91–99.

Liu, Z.X., Govindarajan, S., Okamoto, S., and Dennert, G. (2000). NK cells cause liver injury and facilitate the induction of T cell-mediated immunity to a viral liver infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 164, 6480–6486.

Liu, Z.-X., Govindarajan, S., and Kaplowitz, N. (2004). Innate immune system plays a critical role in determining the progression and severity of acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology* 127, 1760–1774.

Locksley, R.M., Killeen, N., and Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487–501.

Lucena, M.I., García-Martín, E., Andrade, R.J., Martínez, C., Stephens, C., Ruiz, J.D., Ulzurrun, E., Fernandez, M.C., Romero-Gomez, M., Castiella, A., et al. (2010a). Mitochondrial superoxide dismutase and glutathione peroxidase in idiosyncratic drug-induced liver injury. *Hepatology* 52, 303–312.

Lucena, M.I., García-Martín, E., Andrade, R.J., Martínez, C., Stephens, C., Ruiz, J.D., Ulzurrun, E., Fernandez, M.C., Romero-Gomez, M., Castiella, A., et al. (2010b). Mitochondrial superoxide dismutase and glutathione peroxidase in idiosyncratic drug-induced liver injury. *Hepatology* 52, 303–312.

Luyendyk, J.P., Maddox, J.F., Cosma, G.N., Ganey, P.E., Cockerell, G.L., and Roth, R.A. (2003). Ranitidine Treatment during a Modest Inflammatory Response Precipitates Idiosyncrasy-Like Liver Injury in Rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307, 9–16.

M K Slifka, R.R. and P. (2000). NK Markers Are Expressed on a High Percentage of Virus-Specific CD8 and CD4 T Cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 164, 2009–2015.

Ma, X., Hua, J., and Li, Z. (2008). Probiotics improve high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance by increasing hepatic NKT cells. *J. Hepatol.* 49, 821–830.

MacPhee, P.J., Schmidt, E.E., and Groom, A.C. (1995). Intermittence of blood flow in liver sinusoids, studied by high-resolution in vivo microscopy. *Am. J. Physiol.* 269, G692-698.

MALHI, H., GUICCIARDI, M.E., and GORES, G.J. (2010). Hepatocyte Death: A Clear and Present Danger. *Physiol. Rev.* 90, 1165–1194.

Martinou, J.C., Desagher, S., and Antonsson, B. (2000). Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. *Nat. Cell Biol.* 2, E41-43.

Masson, M.J., Carpenter, L.D., Graf, M.L., and Pohl, L.R. (2008). Pathogenic role of natural killer T and natural killer cells in acetaminophen-induced liver injury in mice is dependent on the presence of dimethyl sulfoxide. *Hepatology* 48, 889–897.

Masubuchi, Y., Suda, C., and Horie, T. (2005). Involvement of mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced liver injury in mice. *J. Hepatol.* 42, 110–116.

- Matsson, E.M., Palm, J.E., Eriksson, U.G., Bottner, P., Lundahl, A., Knutson, L., and Lenner-näs, H. (2011). Effects of Ketoconazole on the In Vivo Biotransformation and Hepatobilia-ry Transport of the Thrombin Inhibitor AZD0837 in Pigs. *Drug Metab. Dispos.* *39*, 239–246.
- Matsumoto, M., and Seya, T. (2008). TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Adv. Drug Deliv. Rev.* *60*, 805–812.
- McDonnell, M.A., Wang, D., Khan, S.M., Vander Heiden, M.G., and Kelekar, A. (2003). Caspase-9 is activated in a cytochrome c-independent manner early during TNF $\alpha$ -induced apoptosis in murine cells. *Cell Death Differ.* *10*, 1005–1015.
- McIntyre, K.W., and Welsh, R.M. (1986). Accumulation of natural killer and cytotoxic T large granular lymphocytes in the liver during virus infection. *J. Exp. Med.* *164*, 1667–1681.
- McMahon, C.W., and Raulet, D.H. (2001). Expression and function of NK cell receptors in CD8+ T cells. *Curr. Opin. Immunol.* *13*, 465–470.
- Meier, Y., Cavallaro, M., Roos, M., Pauli-Magnus, C., Folkers, G., Meier, P.J., and Fattinger, K. (2005). Incidence of drug-induced liver injury in medical inpatients. *Eur. J. Clin. Phar-macol.* *61*, 135–143.
- Meyers, L.L., Beierschmitt, W.P., Khairallah, E.A., and Cohen, S.D. (1988). Acetaminophen-induced inhibition of hepatic mitochondrial respiration in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *93*, 378–387.
- Minagawa, M., Deng, Q., Liu, Z., Tsukamoto, H., and Dennert, G. (2004). Activated natural killer T cells induce liver injury by Fas and tumor necrosis factor- $\alpha$  during alcohol con-sumption. *Gastroenterology* *126*, 1387–1399.
- Mitchell, J.R., Jollow, D.J., Potter, W.Z., Gillette, J.R., and Brodie, B.B. (1973). Acetamino-phen-Induced Hepatic Necrosis. Iv. Protective Role of Glutathione. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *187*, 211–217.
- Mombaerts, P., Mizoguchi, E., Ljunggren, H.G., Iacomini, J., Ishikawa, H., Wang, L., Grus-by, M.J., Glimcher, L.H., Winn, H.J., and Bhan, A.K. (1994). Peripheral lymphoid develop-ment and function in TCR mutant mice. *Int. Immunol.* *6*, 1061–1070.
- Morio, L.A., Chiu, H., Sprowles, K.A., Zhou, P., Heck, D.E., Gordon, M.K., and Laskin, D.L. (2001). Distinct roles of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide in acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *172*, 44–51.
- Nagata, S., and Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science* *267*, 1449–1456.
- Nagy, G., Szarka, A., Lotz, G., Dóczy, J., Wunderlich, L., Kiss, A., Jemnitz, K., Veres, Z., Bán-hegyi, G., Schaff, Z., et al. (2010). BGP-15 inhibits caspase-independent programmed cell death in acetaminophen-induced liver injury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *243*, 96–103.

Nemerow, G.R. (2013). Coagulation factor defends adenovirus from immune attack. *Nat. Med.* 19, 406–407.

Neve, E.P.A., Nordling, Å., Andersson, T.B., Hellman, U., Diczfalusy, U., Johansson, I., and Ingelman-Sundberg, M. (2012). Amidoxime Reductase System Containing Cytochrome b5 Type B (CYB5B) and MOSC2 Is of Importance for Lipid Synthesis in Adipocyte Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 287, 6307–6317.

Neve, E.P.A., Köfeler, H., Hendriks, D.F.G., Nordling, Å., Gogvadze, V., Mkrtchian, S., Näslund, E., and Ingelman-Sundberg, M. (2015). Expression and Function of mARC: Roles in Lipogenesis and Metabolic Activation of Ximelagatran. *PLoS One* 10, e0138487.

Nguyen, G.C., Sam, J., and Thuluvath, P.J. (2008). Hepatitis C is a predictor of acute liver injury among hospitalizations for acetaminophen overdose in the United States: a nationwide analysis. *Hepatology* 48, 1336–1341.

Nicholson, D.W., and Thornberry, N.A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.* 22, 299–306.

Ochi, M., Ohdan, H., Mitsuta, H., Onoe, T., Tokita, D., Hara, H., Ishiyama, K., Zhou, W., Tanaka, Y., and Asahara, T. (2004). Liver NK cells expressing TRAIL are toxic against self hepatocytes in mice. *Hepatology* 39, 1321–1331.

Odin, J.A., Huebert, R.C., Casciola-Rosen, L., LaRusso, N.F., and Rosen, A. (2001). Bcl-2-dependent oxidation of pyruvate dehydrogenase-E2, a primary biliary cirrhosis autoantigen, during apoptosis. *J. Clin. Invest.* 108, 223–232.

Olsson, S.B., and Executive Steering Committee of the SPORTIF III Investigators (2003). Stroke prevention with the oral direct thrombin inhibitor ximelagatran compared with warfarin in patients with non-valvular atrial fibrillation (SPORTIF III): randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* 362, 1691–1698.

Ong, M.M.K., Latchoumycandane, C., and Boelsterli, U.A. (2007). Troglitazone-Induced Hepatic Necrosis in an Animal Model of Silent Genetic Mitochondrial Abnormalities. *Toxicol. Sci.* 97, 205–213.

Özcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.-H., Iwakoshi, N.N., Özdelen, E., Tuncman, G., Görğün, C., Glimcher, L.H., and Hotamisligil, G.S. (2004). Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, and Type 2 Diabetes. *Science* 306, 457–461.

Özören, N., and El-Deiry, W.S. (2002). Defining Characteristics of Types I and II Apoptotic Cells in Response to TRAIL. *Neoplasia* N. Y. N 4, 551–557.

P, E., and Gumusel B, K. (2015). Endoplasmic Reticulum Stress in Drug-Induced Liver Injury and Liver Diseases: An Unlighted Novel Mechanism. *J. Liver Dis. Transplant.* 04.

Parameswaran, N., and Patial, S. (2010). Tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling in macrophages. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 20, 87–103.

- Park, O., Jeong, W.-I., Wang, L., Wang, H., Lian, Z.-X., Gershwin, M.E., and Gao, B. (2009). Diverse roles of invariant natural killer T cells in liver injury and fibrosis induced by carbon tetrachloride. *Hepatology*. Baltimore, Md 49, 1683–1694.
- Parker, A.L., Waddington, S.N., Nicol, C.G., Shayakhmetov, D.M., Buckley, S.M., Denby, L., Kembell-Cook, G., Ni, S., Lieber, A., McVey, J.H., et al. (2006). Multiple vitamin K-dependent coagulation zymogens promote adenovirus-mediated gene delivery to hepatocytes. *Blood* 108, 2554–2561.
- Pessayre, D., Mansouri, A., Berson, A., and Fromenty, B. (2010). Mitochondrial involvement in drug-induced liver injury. *Handb. Exp. Pharmacol.* 311–365.
- Porter, A.G., and Jänicke, R.U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 6, 99–104.
- Protzer, U., Maini, M.K., and Knolle, P.A. (2012). Living in the liver: hepatic infections. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 201–213.
- Raff, M. (1998). Cell suicide for beginners. *Nature* 396, 119–122.
- Ramachandran, A., Lebofsky, M., Weinman, S.A., and Jaeschke, H. (2011a). The impact of partial manganese superoxide dismutase (SOD2)-deficiency on mitochondrial oxidant stress, DNA fragmentation and liver injury during acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 251, 226–233.
- Ramachandran, A., Lebofsky, M., Baines, C.P., Lemasters, J.J., and Jaeschke, H. (2011b). Cyclophilin D deficiency protects against acetaminophen-induced oxidant stress and liver injury. *Free Radic. Res.* 45, 156–164.
- Raucy, J.L., Lasker, J.M., Lieber, C.S., and Black, M. (1989). Acetaminophen activation by human liver cytochromes P450IIE1 and P450IA2. *Arch. Biochem. Biophys.* 271, 270–283.
- Ravichandran, K.S. (2010). Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *J. Exp. Med.* 207, 1807–1817.
- Rehermann, B., and Nascimbeni, M. (2005). Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 215–229.
- Reuben, A., Koch, D.G., Lee, W.M., and Acute Liver Failure Study Group (2010). Drug-induced acute liver failure: results of a U.S. multicenter, prospective study. *Hepatology*. Baltimore, Md 52, 2065–2076.
- Riddle-Taylor, E., Nagasaki, K., Lopez, J., Esquivel, C.O., Martinez, O.M., and Krams, S.M. (2007). Mutations to Bid Cleavage Sites Protect Hepatocytes From Apoptosis After Ischemia/Reperfusion Injury. *Transplantation* 84, 778–785.
- Rizzuto, R., and Pozzan, T. (2006). Microdomains of intracellular Ca<sup>2+</sup>: molecular determinants and functional consequences. *Physiol. Rev.* 86, 369–408.

Roth, R.A., and Ganey, P.E. (2011). Animal models of idiosyncratic drug-induced liver injury--current status. *Crit. Rev. Toxicol.* *41*, 723–739.

Roth, G.A., Krenn, C., Brunner, M., Moser, B., Ploder, M., Spittler, A., Pelinka, L., Sautner, T., Wolner, E., Boltz-Nitulescu, G., et al. (2004). Elevated serum levels of epithelial cell apoptosis-specific cytokeratin 18 neoepitope m30 in critically ill patients. *Shock Augusta Ga* *22*, 218–220.

Ruoquan, Y., Wanpin, N., Qiangsheng, X., Guodong, T., and Feizhou, H. (2013). Correlation between plasma miR-122 expression and liver injury induced by hepatectomy. *J. Int. Med. Res.* 0300060513499093.

van Ryn, J., Stangier, J., Haertter, S., Liesenfeld, K.-H., Wiene, W., Feuring, M., and Clemens, A. (2010). Dabigatran etexilate--a novel, reversible, oral direct thrombin inhibitor: interpretation of coagulation assays and reversal of anticoagulant activity. *Thromb. Haemost.* *103*, 1116–1127.

Saito, C., Zwingmann, C., and Jaeschke, H. (2010). Novel mechanisms of protection against acetaminophen hepatotoxicity in mice by glutathione and N-acetylcysteine. *Hepatology. Baltim. Md* *51*, 246–254.

Samali, A., FitzGerald, U., Deegan, S., Gupta, S., Samali, A., FitzGerald, U., Deegan, S., and Gupta, S. (2010). Methods for Monitoring Endoplasmic Reticulum Stress and the Unfolded Protein Response, Methods for Monitoring Endoplasmic Reticulum Stress and the Unfolded Protein Response. *Int. J. Cell Biol. Int. J. Cell Biol.* *2010*, *2010*, e830307.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Kramer, P.H., and Peter, M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* *17*, 1675–1687.

Schölzel, K., Schildberg, F.A., Welz, M., Börner, C., Geiger, S., Kurts, C., Heikenwälder, M., Knolle, P.A., and Wöhleber, D. (2014). Transfer of MHC-class-I molecules among liver sinusoidal cells facilitates hepatic immune surveillance. *J. Hepatology.* *61*, 600–608.

Schuettrumpf, J., Zou, J., Zhang, Y., Schlachterman, A., Liu, Y.-L., Edmonson, S., Xiao, W., and Arruda, V.R. (2006). The Inhibitory Effects of Anticoagulation on in Vivo Gene Transfer by Adeno-associated Viral or Adenoviral Vectors. *Mol. Ther.* *13*, 88–97.

Schulman, S., Kearon, C., Kakkar, A.K., Mismetti, P., Schellong, S., Eriksson, H., Baanstra, D., Schnee, J., and Goldhaber, S.Z. (2009). Dabigatran versus Warfarin in the Treatment of Acute Venous Thromboembolism. *N. Engl. J. Med.* *361*, 2342–2352.

Sgro, C., Clinard, F., Ouazir, K., Chanay, H., Allard, C., Guilleminet, C., Lenoir, C., Lemoine, A., and Hillon, P. (2002). Incidence of drug-induced hepatic injuries: a French population-based study. *Hepatology. Baltim. Md* *36*, 451–455.

Shaw, P.J., Hopfensperger, M.J., Ganey, P.E., and Roth, R.A. (2007). Lipopolysaccharide and Trovafloxacin Coexposure in Mice Causes Idiosyncrasy-Like Liver Injury Dependent on

Tumor Necrosis Factor-Alpha. *Toxicol. Sci.* **100**, 259–266.

Shaw, P.J., Ganey, P.E., and Roth, R.A. (2009a). Trovafloxacin Enhances the Inflammatory Response to a Gram-Negative or a Gram-Positive Bacterial Stimulus, Resulting in Neutrophil-Dependent Liver Injury in Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **330**, 72–78.

Shaw, P.J., Ditewig, A.C., Waring, J.F., Liguori, M.J., Blomme, E.A., Ganey, P.E., and Roth, R.A. (2009b). Coexposure of Mice to Trovafloxacin and Lipopolysaccharide, a Model of Idiosyncratic Hepatotoxicity, Results in a Unique Gene Expression Profile and Interferon Gamma-Dependent Liver Injury. *Toxicol. Sci.* **107**, 270–280.

Shaw, P.J., Ganey, P.E., and Roth, R.A. (2009c). Tumor Necrosis Factor $\alpha$  Is a Proximal Mediator of Synergistic Hepatotoxicity from Trovafloxacin/Lipopolysaccharide Coexposure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **328**, 62–68.

Shaw, P.J., Ganey, P.E., and Roth, R.A. (2010). Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury and the Role of Inflammatory Stress with an Emphasis on an Animal Model of Trovafloxacin Hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* **118**, 7–18.

Shayakhmetov, D.M., Gaggar, A., Ni, S., Li, Z.-Y., and Lieber, A. (2005). Adenovirus Binding to Blood Factors Results in Liver Cell Infection and Hepatotoxicity. *J. Virol.* **79**, 7478–7491.

Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., and Stall, A.M. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* **68**, 855–867.

Simpson, K.J., Lukacs, N.W., McGregor, A.H., Harrison, D.J., Strieter, R.M., and Kunkel, S.L. (2000). Inhibition of tumour necrosis factor alpha does not prevent experimental paracetamol-induced hepatic necrosis. *J. Pathol.* **190**, 489–494.

Squizzato, A., Dentali, F., Steidl, L., and Ageno, W. (2009). New direct thrombin inhibitors. *Intern. Emerg. Med.* **4**, 479–484.

Stabenow, D., Frings, M., Trück, C., Gärtner, K., Förster, I., Kurts, C., Tüting, T., Odenthal, M., Dienes, H.-P., Cederbrant, K., et al. (2010a). Bioluminescence imaging allows measuring CD8 T cell function in the liver. *Hepatology* **51**, 1430–1437.

Stabenow, D., Frings, M., Trück, C., Gärtner, K., Förster, I., Kurts, C., Tüting, T., Odenthal, M., Dienes, H.-P., Cederbrant, K., et al. (2010b). Bioluminescence imaging allows measuring CD8 T cell function in the liver. *Hepatology* **51**, 1430–1437.

Stahlmann, R. (2002). Clinical toxicological aspects of fluoroquinolones. *Toxicol. Lett.* **127**, 269–277.

Stewart, J.D., Horvath, R., Baruffini, E., Ferrero, I., Bulst, S., Watkins, P.B., Fontana, R.J., Day, C.P., and Chinnery, P.F. (2010). Polymerase  $\gamma$  gene POLG determines the risk of sodium valproate-induced liver toxicity. *Hepatology* **52**, 1791–1796.

- Sutton, V.R., Davis, J.E., Cancilla, M., Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., Sedelies, K., Browne, K.A., and Trapani, J.A. (2000). Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. *J. Exp. Med.* *192*, 1403–1414.
- Szewczyk, A., and Wojtczak, L. (2002). Mitochondria as a Pharmacological Target. *Pharmacol. Rev.* *54*, 101–127.
- Takeda, K., Hayakawa, Y., Van Kaer, L., Matsuda, H., Yagita, H., and Okumura, K. (2000). Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 5498–5503.
- Tarantino, G., Conca, P., Basile, V., Gentile, A., Capone, D., Polichetti, G., and Leo, E. (2007). A prospective study of acute drug-induced liver injury in patients suffering from non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hepatol.* *37*, 410–415.
- Tavassoli, M., Kishimoto, T., and Kataoka, M. (1986a). Liver endothelium mediates the hepatocyte's uptake of ceruloplasmin. *J. Cell Biol.* *102*, 1298–1303.
- Tavassoli, M., Kishimoto, T., Soda, R., Kataoka, M., and Harjes, K. (1986b). Liver endothelium mediates the uptake of iron-transferrin complex by hepatocytes. *Exp. Cell Res.* *165*, 369–379.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 231–241.
- Temple, R.J., and Himmel, M.H. (2002). Safety of newly approved drugs: implications for prescribing. *JAMA* *287*, 2273–2275.
- Thomson, A.W., and Knolle, P.A. (2010). Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 753–766.
- Tsunedomi, R., Iizuka, N., Hamamoto, Y., Uchimura, S., Miyamoto, T., Tamesa, T., Okada, T., Takemoto, N., Takashima, M., Sakamoto, K., et al. (2005). Patterns of expression of cytochrome P450 genes in progression of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Int. J. Oncol.* *27*, 661–667.
- Tujios, S., and Fontana, R.J. (2011). Mechanisms of drug-induced liver injury: from bedside to bench. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *8*, 202–211.
- Ungo, J.R., Jones, D., Ashkin, D., Hollender, E.S., Bernstein, D., Albanese, A.P., and Pitche-  
nik, A.E. (1998). Antituberculosis Drug-induced Hepatotoxicity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *157*, 1871–1876.
- Waddington, S.N., McVey, J.H., Bhella, D., Parker, A.L., Barker, K., Atoda, H., Pink, R., Buckley, S.M.K., Greig, J.A., Denby, L., et al. (2008). Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer. *Cell* *132*, 397–409.

- Wang, K. (2014). Molecular mechanisms of hepatic apoptosis. *Cell Death Dis.* 5, e996.
- Waring, J.F., Liguori, M.J., Luyendyk, J.P., Maddox, J.F., Ganey, P.E., Stachlewitz, R.F., North, C., Blomme, E.A.G., and Roth, R.A. (2006). Microarray Analysis of Lipopolysaccharide Potentiation of Trovafloxacin-Induced Liver Injury in Rats Suggests a Role for Proinflammatory Chemokines and Neutrophils. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316, 1080–1087.
- Warren, A., Le Couteur, D.G., Fraser, R., Bowen, D.G., McCaughan, G.W., and Bertolino, P. (2006). T lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 44, 1182–1190.
- Weitz, J.I. (2003). A novel approach to thrombin inhibition. *Thromb. Res.* 109 Suppl 1, S17-22.
- Wiltrout, R.H. (2000). Regulation and antimetastatic functions of liver-associated natural killer cells. *Immunol. Rev.* 174, 63–76.
- Winnock, M., Garcia Barcina, M., Lukomska, B., Huet, S., Saric, J., Balabaud, C., and Bioulac-Sage, P. (1995). Human liver-associated lymphocytes: an overview. *J. Gastroenterol. Hepatology* 10 Suppl 1, S43-46.
- Wintermeyer, P., Cheng, C.-W., Gehring, S., Hoffman, B.L., Holub, M., Brossay, L., and Gregory, S.H. (2009). Invariant natural killer T cells suppress the neutrophil inflammatory response in a mouse model of cholestatic liver damage. *Gastroenterology* 136, 1048–1059.
- Wisse, E. (1970). An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *J. Ultrastruct. Res.* 31, 125–150.
- Wisse, E., De Zanger, R.B., Charels, K., Van Der Smissen, P., and McCuskey, R.S. (1985). The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. *Hepatology* 5, 683–692.
- Wohlleber, D., Kashkar, H., Gärtner, K., Frings, M.K., Odenthal, M., Hegenbarth, S., Börner, C., Arnold, B., Hämmerling, G., Nieswandt, B., et al. (2012a). TNF-induced target cell killing by CTL activated through cross-presentation. *Cell Rep.* 2, 478–487.
- Wohlleber, D., Kashkar, H., Gärtner, K., Frings, M.K., Odenthal, M., Hegenbarth, S., Börner, C., Arnold, B., Hämmerling, G., Nieswandt, B., et al. (2012b). TNF-induced target cell killing by CTL activated through cross-presentation. *Cell Rep.* 2, 478–487.
- Wong, W.M., Wu, P.C., Yuen, M.F., Cheng, C.C., Yew, W.W., Wong, P.C., Tam, C.M., Leung, C.C., and Lai, C.L. (2000). Antituberculosis drug-related liver dysfunction in chronic hepatitis B infection. *Hepatology* 31, 201–206.
- Wree, A., Dechêne, A., Herzer, K., Hilgard, P., Syn, W.-K., Gerken, G., and Canbay, A. (2011). Steroid and ursodesoxycholic Acid combination therapy in severe drug-induced liver injury. *Digestion* 84, 54–59.

Wright, R., Eade, O.E., Chisholm, M., Hawksley, M., Lloyd, B., Moles, T.M., Edwards, J.C., and Gardner, M.J. (1975). Controlled prospective study of the effect on liver function of multiple exposures to halothane. *Lancet Lond. Engl.* *1*, 817–820.

Wu, J.C., Lee, S.D., Yeh, P.F., Chan, C.Y., Wang, Y.J., Huang, Y.S., Tsai, Y.T., Lee, P.Y., Ting, L.P., and Lo, K.J. (1990). Isoniazid-rifampin-induced hepatitis in hepatitis B carriers. *Gastroenterology* *98*, 502–504.

Xu, Z., Qiu, Q., Tian, J., Smith, J.S., Conenello, G.M., Morita, T., and Byrnes, A.P. (2013a). Coagulation factor X shields adenovirus type 5 from attack by natural antibodies and complement. *Nat. Med.* *19*, 452–457.

Xu, Z., Qiu, Q., Tian, J., Smith, J.S., Conenello, G.M., Morita, T., and Byrnes, A.P. (2013b). Coagulation factor X shields adenovirus type 5 from attack by natural antibodies and complement. *Nat. Med.* *19*, 452–457.

Yamaguchi, T., Kawabata, K., Kouyama, E., Ishii, K.J., Katayama, K., Suzuki, T., Kurachi, S., Sakurai, F., Akira, S., and Mizuguchi, H. (2010). Induction of type I interferon by adenovirus-encoded small RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 17286–17291.

Yang, Y., Xiang, Z., Ertl, H.C., and Wilson, J.M. (1995). Upregulation of class I major histocompatibility complex antigens by interferon gamma is necessary for T-cell-mediated elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 7257–7261.

Zaher, H., Buters, J.T.M., Ward, J.M., Bruno, M.K., Lucas, A.M., Stern, S.T., Cohen, S.D., and Gonzalez, F.J. (1998). Protection against Acetaminophen Toxicity in CYP1A2 and CYP2E1 Double-Null Mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *152*, 193–199.

Zimmerman, H.J. (1999). *Hepatotoxicity: the adverse effects of drugs and other chemicals on the liver* (Lippincott Williams & Wilkins).

Zimmermann, K.C., Bonzon, C., and Green, D.R. (2001). The machinery of programmed cell death. *Pharmacol. Ther.* *92*, 57–70.

Zou, H., Li, Y., Liu, X., and Wang, X. (1999). An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* *274*, 11549–11556.

Zou, W., Devi, S.S., Sparkenbaugh, E., Younis, H.S., Roth, R.A., and Ganey, P.E. (2009). Hepatotoxic Interaction of Sulindac with Lipopolysaccharide: Role of the Hemostatic System. *Toxicol. Sci.* *108*, 184–193.

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Metabolismus von Ximelagatran zu Melagatran.....	20
Abb. 2: Experimentelles Setup der in vivo Modelle für XIM-induzierten Leberschaden..	38
Abb. 3: XIM verstärkt den Leberschaden in Virus-infizierten Mäusen.....	49
Abb. 4: Verstärkter Leberschaden und Letalität in rag2-/- Mäusen nach AdGOL Infektion und XIM-Behandlung.....	51
Abb. 5: TNF-R1/2-/- Mäuse sind vor erhöhtem Leberschaden und Letalität durch XIM protektiert.....	53
Abb. 6: Vergleich von TVX/LPS mit XIM/LPS Koadministration. ....	56
Abb. 7: XIM induziert im Modell für virale Hepatitis mit LCMV verstärkten Leberschaden und Mortalität.....	59
Abb. 8: XIM induziert im Modell für virale Hepatitis mit Adenovirus verstärkten Leberschaden und Letalität.....	61
Abb. 9: Analyse der Gerinnungszeit nach Verabreichung von XIM, DAB oder Carrier.....	63
Abb. 10: XIM-DILI wird nicht durch Thrombin-Inhibition hervorgerufen. ....	65
Abb. 11: Ausschließlich hohe Viruslast induziert XIM-DILI.....	67
Abb. 12: Ausschließlich längere XIM-Adminstration induziert erhöhten Leberschaden und Letalität.....	69
Abb. 13: Verstärkte Leberschädigung und Caspase 3 Aktivierung in XIM-behandelten virus-infizierten Mäusen nach TNF-Gabe.....	71
Abb. 14: Aktivierung von Caspase 8, 9 und 3/7 nach TNF bei XIM-DILI.....	73
Abb. 15: Protektiver Effekt von Caspase-Inhibition auf XIM-DILI bei Adenovirus Infektion. ....	74
Abb. 16: Protektiver Effekt von Caspase-Inhibition auf XIM-DILI bei LCMV Infektion. ....	76
Abb. 17: Die Expression der ER-Stress Marker CHOP und GRP78 ist durch Virusinfektion und/oder XIM-Behandlung nicht verändert. ....	78
Abb. 18: Mitochondrien von ex vivo XIM-behandelten Mäusen zeigen keine veränderte Sensitivität gegenüber Calcium. ....	81
Abb. 19: Mitochondrien von in vivo XIM-behandelten und Adenovirus-infizierten Mäusen sind sensitiver gegenüber Calcium. ....	82

## TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Verwendete Stammlösungen für die Herstellung des Schwellungs-Puffers und zur Bestimmung des Membranpotentials bzw. der Schwellung der Mitochondrien.....	42
Tab. 2: Zusammensetzung des Schwellungs-Puffers.....	42
Tab. 3: Verdünnungen der Stammlösungen, die zur Untersuchung von Membranpotential bzw. Schwellung der Mitochondrien benötigt werden und Endkonzentration in der Platte. .....	43
Tab. 4: Berechnung der Viruskonzentration mittels eingesetzter Viruslösung .....	46

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AIF	Apoptose-induzierender Faktor
ALT	Alanin-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
APAF-1	engl.: <i>Apoptotic protease activating factor 1</i> (Apoptose-Protease-aktivierender Faktor)
AZD	AZD0837
b.i.d.	latein: <i>bis in die</i> (zweimal täglich)
CCR2	C-C Chemokin-Rezeptor 2
CHOP	engl.: <i>C/EBP homologous protein</i>
CMV	Cytomegalovirus
CsA	Cyclosporin A
CTL	engl.: <i>cytotoxic T lymphocyte</i> (Zytotoxischer T- Lymphocyt)
d	Tag
DAB	Dabigatran etexilat
DILI	engl.: <i>drug-induced liver injury</i> (Medikamenten-induzierte Leberschädigung)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	engl.: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
FCCP	Carbonylcyanid-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazon
FX	Faktor X
g	Gramm, Erdbeschleunigung (9,81m/s <sup>2</sup> )
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GRP	engl.: <i>78 kDa glucose-regulated protein</i>
GSH	Glutathion
h	Stunde
HAV	Hepatitis A Virus

HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HE	Hämatoxylin Eosin
HEV	Hepatitis E Virus
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
iDILI	engl.: <i>idiosyncratic drug-induced liver injury</i> (idiosynkratische medikamenten-induzierte Leberschädigung)
IFN $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
l	Liter
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus
LSEC	engl.: <i>liver sinusoidal endothelial cells</i> (sinusoidale Endothelzellen der Leber)
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
m	milli , Meter
$\mu$	mikro
MEL	Melagatran
min	Minute
mARC2	engl.: <i>mitochondrial amidoxime reducing component 2</i>
MHC	engl.: <i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
mPTP	engl.: <i>mitochondrial permeability transition pore</i> (mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore)
MOMP	engl.: <i>mitochondrial outer membrane permeabilization</i> (mitochondriale Außenmembran-Permeabilisierung)
n	nano
NAFLD	engl.: <i>non-alcoholic fatty liver disease</i> (nichtalkoholische Fettlebererkrankung)

NAPQI	<i>N</i> -Acetyl- <i>p</i> -benzochinonimin
NK Zelle	natürliche Killerzelle
NKT Zelle	Natürliche Killer T Zelle
OVA	Ovalbumin
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PFU	engl.: <i>plaque-forming unit</i>
p.o.	peroral
polyl:C	engl.: <i>polyinosinic-polycytidylic acid</i>
Rh123	Rhodamin 123
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	engl.: <i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	engl.: <i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
SEM	engl.: <i>standard error of the mean</i> (Standardfehler des Mittelwertes)
SPF	engl.: <i>specific pathogen free</i>
SOD	Superoxid-Dismutase
SWP	Schwellungspuffer
t-Bid	engl.: <i>truncated Bid</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF-R	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRAIL	engl.: <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TVX	Trovafloracin
U	Unit(s), Einheit der Enzymaktivität
UPR	engl.: <i>unfolded protein response</i> (ungefaltete Proteinantwort)
v/v	engl.: <i>volume to volume</i> (Verhältnis von Volumenn zu Volumen)
Wt	Wildtyp
w/v	engl.: <i>weight to volume</i> (Verhältnis von Masse zu Volumen)
XIM	Ximelagatran
XIM-DILI	engl.: <i>Ximelagatran-induced liver injury</i> (Ximelagatran-induzierte Leberschädigung)