

Rolle der Aktivierung des *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma* durch Pioglitazon in der hepatischen Immunregulation

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Rike Schulte

aus

Herne

Bonn 2011

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

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Molekulare Medizin und Experimentelle
Immunologie am Universitätsklinikum Bonn angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Percy Knolle
2. Gutachter: Prof. Dr. Waldemar Kolanus

Tag der Promotion: 08.12.2011

Erscheinungsjahr: 2012

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 6 der Promotionsordnung vom 03.06.2011 im Zeitraum von Januar 2008 bis September 2011 von Herrn Prof. Dr. Knolle betreut.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass

- die vorgelegte Arbeit – abgesehen von den ausdrücklich bezeichneten Hilfsmitteln – persönlich, selbständig 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 Personen) 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 29.09.2011

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
ABSTRACT	II
I. EINLEITUNG.....	1
1. Die Leber.....	1
1.1 Funktion der Leber	1
1.2 Mikroanatomie der Leber.....	2
1.3 Immunpathologie in der Leber	3
2. Der Transkriptionsfaktor <i>Peroxisome Proliferator-activated receptor-gamma</i>	5
2.1 Die <i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i> -Familie nukleärer Rezeptoren	5
2.2 Aufbau von PPAR γ	6
2.3 Die Funktion des Transkriptionsfaktors PPAR γ	8
2.3.1 PPAR γ und angeborene Immunität	8
2.3.2 PPAR γ und adaptive Immunität.....	11
2.4 Regulation der PPAR γ -Aktivität.....	13
2.5 PPAR γ Liganden	15
II. ZIEL DER ARBEIT	18
III. MATERIAL UND METHODEN	19
1. Material.....	19
1.1 Geräte	19
1.2 Verbrauchsmaterialien.....	20
1.3 Chemikalien und Reagenzien.....	21
1.4 Allgemeine Lösungen	23
1.4.1 Medien.....	23
1.4.2 Puffer	23
1.5 Reaktionskits.....	25
1.6 Antikörper	26
1.7 Antikörper-beschichtete magnetische Kügelchen (MACS-Beads)	27
1.8 Cytokine.....	27
1.9 Enzyme.....	27

1.10	Fluoreszenzfarbstoffe und Fluorophorkonjugate.....	27
1.11	TLR Liganden.....	28
1.12	Inhibitoren.....	28
1.13	Primer.....	29
1.14	Zelllinien.....	29
1.15	Mauslinien.....	29
2.	Methoden.....	30
2.1	Zellisolation.....	30
2.1.1	Die Isolation von Zellpopulationen über magnetische Zellseparation (MACS).....	30
2.1.2	Isolation primärer Zellen aus der Leber.....	31
2.1.3	Isolation primärer Zellen aus Milz und Lymphknoten.....	32
2.2	Zellzahlbestimmung.....	33
2.3	Transfektion von LSEC.....	34
2.4	Restimulation von T Zellen <i>ex vivo</i>	34
2.5	Durchflusszytometrie.....	34
2.5.1	Markierung von Oberflächenantigenen.....	35
2.5.2	Intrazelluläre Färbung von Antigenen.....	35
2.5.3	Durchflusszytometrische Analyse der Zellproliferation.....	36
2.6	<i>In vitro</i> Kokultur und Analyse von T Zell-Funktionen.....	36
2.7	ELISA.....	37
2.8	Molekularbiologische Typisierung.....	38
2.8.1	DNA Präparation aus Gewebe.....	38
2.8.2	PCR Reaktion.....	38
2.9	Quantifizierung intrahepatischer Zytokine.....	40
2.9.1	RNA-Aufreinigung aus Lebergewebe.....	40
2.9.2	Reverse Transkription.....	40
2.9.3	<i>Real-Time</i> PCR.....	41
2.9.4	Agarosegelelektrophorese.....	41
2.10	Angewandte Modelle der experimentellen Hepatitis.....	42
2.10.1	Concanavalin A (ConA) vermittelte Entzündung der Leber.....	42
2.10.2	Das Galaktosamin/LPS-Hepatitis-Modell.....	42
2.11	Makrophagen-Depletion.....	43
2.12	Depletion neutrophiler Granulozyten.....	43
2.13	Generierung T Zell spezifischer PPAR γ <i>Knockout</i> Mäuse.....	43
2.14	Statistische Analysen.....	44

IV. ERGEBNISSE.....	45
1. Einfluss des Transkriptionsfaktors PPARγ auf die Immunfunktion von LSEC	45
1.1 TLR vermittelte Aktivierung	45
1.2 Kreuzpräsentation	48
1.3 Vermittlung von CD8 T Zell Toleranz.....	50
2. Die Funktion von PPARγ in Modellen einer experimentellen Hepatitis	54
2.1 Concanavalin A induzierte Hepatitis	54
2.2 Der Einfluss von PPAR γ auf die Reaktivität von T Zellen <i>in vitro</i>	58
2.2.1 T Zell Rezeptor vermittelte Aktivierung	59
2.2.2 Concanavalin A induzierte T Zell Stimulation	60
2.3 Das Galaktosamin/LPS-Hepatitis-Modell.....	64
V. DISKUSSION.....	74
1. Zellintrinsische Wirkungen der PPARγ Aktivierung auf LSEC.....	74
2. Die Aktivierung von PPARγ nimmt keinen Einfluss auf die durch Concanavalin A induzierte Immunhepatitis.....	76
3. Pioglitazon verstärkt den Leberschaden während einer experimentellen Hepatitis	78
4. Pioglitazon sensitiviert Hepatozyten gegenüber der TNF vermittelten Apoptose.....	80
VI. REFERENZEN	82
VII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	93
VIII. ABKÜRZUNGEN.....	94
CURRICULUM VITAE	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

Zusammenfassung

Der *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR γ) gehört zur Superfamilie nukleärer Faktoren, die nach Ligandenbindung Genexpression regulieren. PPAR γ steuert durch Bindung an PPAR γ -responsive Elemente die Expression metabolischer Gene und reguliert durch Stabilisierung transkriptioneller Repressoren die Expression proinflammatorischer Gene in Immunzellen. In Modellen entzündlicher Erkrankungen des Darmes oder des zentralen Nervensystems, trägt die PPAR γ Aktivierung zu einem verzögerten oder abgeschwächten Krankheitsverlauf bei. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich die pharmakologische Aktivierung von PPAR γ durch den synthetischen PPAR γ Liganden Pioglitazon (Pio) protektiv auf die Entwicklung einer immunvermittelten Hepatitis auswirkt. PPAR γ Aktivierung in sinusoidalen Endothelzellen der Leber (LSEC) regulierte zwar *Toll-like* rezeptorinduzierte Interleukin 6 Expression, hatte aber keinen Einfluss auf deren toleranzinduzierende Funktion als antigenpräsentierende Zellen. Um den Einfluss von PPAR γ Aktivierung auf den Verlauf einer immunvermittelten Hepatitis zu untersuchen, wurden zwei Modelle einer experimentellen Hepatitis verwendet. Obwohl PPAR γ Aktivierung die Expression von Interferon γ (INF γ) und *Tumor Necrosis Factor* (TNF) in T Zellen nach Stimulation mit Concanavalin A (ConA) *in vitro* reduzierte, hatte sie keinen Einfluss auf den Verlauf einer Hepatitis *in vivo*. In Pio behandelten Tieren kam es sogar zu einer verstärkten Expression von TNF, des zentralen, schädigenden Zytokins in der ConA Hepatitis. Deshalb wurde die Rolle von PPAR γ in einem weiteren TNF-abhängigen Hepatitis Modell, der GalN/LPS Hepatitis, untersucht. In diesem Modell verursachte die PPAR γ Aktivierung eine Verschlechterung der Hepatitis, was mit einer erhöhten intrahepatischen TNF Expression in Kupffer Zellen und einer gesteigerten Sensitivität von Hepatozyten gegenüber TNF einher ging. Diese Ergebnisse zeigen, dass PPAR γ keinen Einfluss auf die tolerogene Funktion von LSEC hat und keine organ-protective Rolle in leberspezifischen Entzündungsmodellen besitzt. Die Verschlechterung immunvermittelter Leberschäden durch PPAR γ ist in ihrem molekularen Mechanismus noch nicht verstanden, bildet aber eine neue Erklärung für die Entwicklung medikamentenbedingter Leberschäden, die im Kontext lokaler Entzündung in der Leber auftreten können.

Abstract

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) belongs to the superfamily of nuclear receptors regulating gene expression upon ligand binding. After binding to responsive elements PPAR γ induces the expression of metabolic genes and regulates the expression of proinflammatory cytokines in immune cells by stabilisation of transcriptional repressors. In models of inflammatory gut diseases and diseases of the central nervous system, PPAR γ -activation contributes to the delay of disease onset and ameliorates disease severity. Here we investigated whether the pharmacological activation of PPAR γ by the synthetic PPAR γ ligand Pioglitazone (Pio) also provides protection from immune-mediated hepatitis. Although PPAR γ activation in liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) regulated toll-like receptor induced Interleukin 6 expression it did not influence their tolerogenic function as antigen-presenting cells. To further investigate the function of PPAR γ activation during immune-mediated hepatitis, two models of experimental hepatitis were used. While PPAR γ activation reduced Concanavalin A (ConA) induced Interferon γ (IFN γ) expression as well as Tumor Necrosis Factor (TNF) expression in T cells *in vitro*, it did not influence the course of disease during hepatitis *in vivo*. Pio treated animals showed even higher expression of TNF, the main harmful cytokine during ConA hepatitis. Therefore, the role of PPAR γ in GalN/LPS hepatitis, another TNF-dependent hepatitis model, was investigated. In this model PPAR γ activation led to an increase of hepatic injury, which was associated with increased intrahepatic TNF expression in Kupffer cells and enhanced sensitivity of hepatocytes towards TNF. These results demonstrate that PPAR γ does not influence the tolerogenic function of LSEC but has no organ-protective function in models of liver associated inflammation as well. The aggravation of immune mediated liver injury by PPAR γ is not understood in molecular detail yet but offers a novel explanation for the development of drug induced liver injury appearing in context of local liver inflammation.

I. Einleitung

1. Die Leber

Schädigungen der Leber stellen ein weltweites Gesundheitsproblem dar, das schwerwiegende Folgen wie Leberzirrhose oder Leberkrebs nach sich ziehen kann. Dabei liegt die Aktivierung einer inflammatorischen Immunantwort vielen Lebererkrankungen zu Grunde. Auslöser einer immunvermittelten Leberschädigung können Virusinfektionen (Lai et al., 2003; Poynard et al., 2003), Toxine und Medikamente (Robin et al., 1997; Robin et al., 1996) oder Autoimmunität (Kita et al., 2004; Manns and Strassburg, 2001) sein. Unabhängig von der Ursache sind an der Schädigung des Lebergewebes Immunzellen des innaten und adaptiven Immunsystems beteiligt.

1.1 Funktion der Leber

Die Leber spielt eine wichtige Rolle im Stoffwechsel des Körpers. Sie wird über die Pfortader mit venösem, nährstoffreichem Blut des Gastrointestinaltraktes und über die hepatische Arterie mit sauerstoffreichem Blut aus der systemischen Zirkulation versorgt. In der Leber fließen die beiden Blutströme zusammen und sorgen für eine arteriovenöse Blutversorgung in den Lebersinusoiden, wobei der Anteil venösen Blutes 80% beträgt. Die im Blut mitgeführten Nährstoffe, Endotoxine und anderen Fremdartigene aus dem Darm werden dann in der Leber metabolisiert oder neutralisiert. Dabei ist die strenge Regulation der lokalen Immunantwort unverzichtbar. Die Vermeidung einer Immunantwort gegen harmlose Nahrungsantigene wird durch das immunsuppressive Milieu der Leber gewährleistet, das eher Immuntoleranz als Immunität vermittelt (Crispe, 2003; Knolle and Limmer, 2001). Dass die Leber eine immunologische Funktion besitzt wurde erstmals durch Transplantationsexperimente bekannt, die zeigten, dass auch ohne die Verabreichung von Immunsuppressiva keine Abstoßungsreaktionen gegen Transplantate auftraten (Calne et al., 1969; Cantor and Dumont, 1967). Diese tolerogenen Eigenschaften und

die Tatsache, dass andererseits adäquate Verteidigungsstrategien gegen eindringende Pathogene ablaufen, verdeutlichen die Komplexität der Immunregulation in der Leber.

1.2 Mikroanatomie der Leber

Neben Hepatozyten besteht die Leber hauptsächlich aus Kupffer Zellen, Sternzellen, intrahepatischen Lymphozyten, Dendritischen Zellen (DC¹) und sinusoidalen Endothelzellen (LSEC²). LSEC kleiden die Sinusoide aus, die im Gegensatz zu anderen Blutgefäßen keine Basalmembran besitzen. LSEC bilden so eine Barriere zwischen parenchymalen Hepatozyten und zirkulierenden Lymphozyten (Limmer et al., 1998a; Limmer et al., 1998b; Wisse et al., 1985). Kleine Poren, die sogenannten Fenestrae, trennen die LSEC und ermöglichen den Blutfluss in den Dissé-Raum, was einen direkten Stoffaustausch zwischen Blut und Hepatozyten ermöglicht (Wisse, 1970; Wisse et al., 1985). Durch den geringen Durchmesser der Sinusoide (5-7µm) und die geringe Fließgeschwindigkeit des Blutes (25-250µm/Sek.) stehen passierende Leukozyten in engem Kontakt mit den sinusoidalen Zellpopulationen (MacPhee et al., 1995).

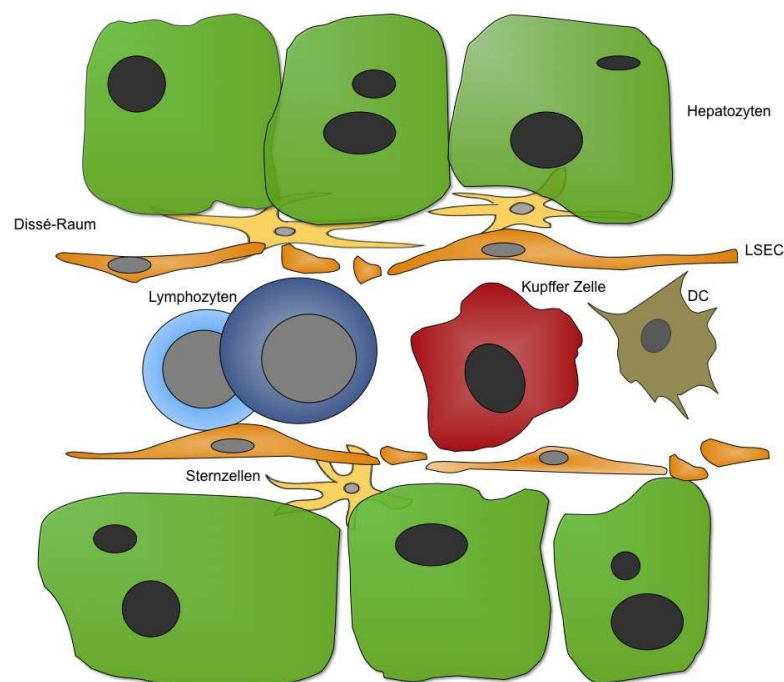


Abb. I.1 Schematische Darstellung eines Lebersinusoids im Längsschnitt

¹ engl. *dendritic cell*

² engl. *liver sinusoidal endothelial cell*

LSEC verfügen über verschiedene Mustererkennungsrezeptoren (PRR³), wie beispielsweise *Scavenger*-Rezeptoren und Mannoserezeptoren, und nehmen darüber sehr effizient Stoffe/Fremdstoffe aus dem Blut auf (Blomhoff et al., 1984; Magnusson and Berg, 1989). Endozytierte Moleküle können anschließend über MHC Klasse II Moleküle an CD4 T Zellen präsentiert werden, was in den CD4 T Zellen einen regulatorischen Phänotyp induziert. Dieser zeichnet sich durch die Produktion von IL-4 und IL-10 aus (Knolle et al., 1999). LSEC können aber auch exogene Antigene über die sogenannte Kreuzpräsentation auf MHC Klasse I Molekülen CD8 T Zellen zur Verfügung stellen. Daraus entwickelt sich eine systemische, antigenspezifische Immuntoleranz, die in dem Verlust der Effektorfunktionen und der zytotoxischen Aktivität der CD8 T Zellen resultiert (Limmer et al., 2000; Schurich et al., 2009). Damit spielen LSEC eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der immunregulatorischen Eigenschaften der Leber.

1.3 Immunpathologie in der Leber

Worauf die Schädigung des Lebergewebes während akuter Hepatitiden beruht wurde an verschiedenen murinen Hepatitismodellen, wie der Concanavalin A (ConA)-Hepatitis oder der Galaktosamin (GalN)/Lipopolysaccharid (LPS) induzierten Lebererkrankung untersucht. ConA ist ein Lektin der Jackbohne und stimuliert als Mitogen T Zellen unabhängig von ihrer Antigenpezifität. Der dadurch verursachte Zytokinsturm regt daraufhin Kupffer Zellen zur Ausschüttung inflammatorischer Moleküle an. Der durch GalN/LPS vermittelte Leberschaden beruht ebenfalls auf der Aktivierung von Kupffer Zellen, hier allerdings durch LPS, und gleichzeitig auf der transkriptionellen Blockade in Hepatozyten, die durch GalN induziert wird.

Diese Studien haben gezeigt, dass maßgeblich TNF die Apoptose und/oder Nekrose in Hepatozyten induziert (Bradham et al., 1998a; Schumann and Tiegs, 1999; Tiegs et al., 1989). Dabei ist TNF in der Leber aber nicht nur Auslöser von Hepatotoxizität, sondern ist ebenfalls notwendig für die Hepatozytenproliferation während der Leberregeneration (Diehl et al., 1994). Makrophagen stellen die Hauptquelle von TNF

³ engl. *pattern recognition receptor*

dar, wobei auch in aktivierten T Zellen, NK Zellen und weiteren Zellpopulationen die Genexpression und Ausschüttung von TNF beschrieben wurde (Beutler and Cerami, 1989; Dinarello et al., 1989; Gantner et al., 1995; Mannel et al., 1980; Wajant et al., 2003).

TNF ist ein Ligand für Rezeptorproteine der TNF-Rezeptor Superfamilie und erzielt seine biologische Funktion durch die Bindung an die TNF-Rezeptoren (TNFR) I und II. Der TNFR I bindet sowohl lösliches als auch membranintegriertes TNF, während der TNFR II ausschließlich durch die Interaktion mit der membrangebundenen Form vollständig aktivierbar ist (Grell et al., 1995; Grell et al., 1998). Da TNF-Rezeptoren keine katalytische Kinasedomäne besitzen, erfolgt die intrazelluläre Signalweiterleitung über rezeptorassoziierte Proteine. Der intrazelluläre Bereich des TNFR I enthält eine konservierte Protein-Protein-Interaktionsdomäne, die sogenannte *death*-Domäne. Durch Ligandenbindung wird das *TNF receptor-associated protein with death domain* (TRADD) an diese intrazelluläre Domäne rekrutiert. TRADD interagiert mit unterschiedlichen Adapterproteinen, die unterschiedliche Signalkaskaden aktivieren. Durch Interaktion mit dem Adaptermolekül *Fas-associated death domain protein* (FADD) wird die Induktion Caspase 8 vermittelter Apoptose gesteuert. Diese geschieht über die mitochondriale Ausschüttung proapoptotischer Faktoren wie Cytochrom c, was die Aktivierung weiterer Caspasen zur Folge hat, die schließlich den Zelltod induzieren (Beyaert et al., 2002). In Hepatozyten kann die Freisetzung von Cytochrom c alternativ über die Caspase vermittelte Ausschüttung von Cathepsin B aus Lysosomen erfolgen (Abb. 1.2) (Guicciardi et al., 2000).

Des Weiteren kann TRADD einen Molekülkomplex aus den Adaptormolekülen *TNF receptor-associated factor 2* (TRAF2) und der *receptor-interacting kinase* (RIP) rekrutieren. Diese Interaktion wirkt der FADD induzierten Caspaseaktivierung partiell entgegen, wobei NFκB den Schlüsselfaktor darstellt (Beyaert et al., 2002). NFκB kann sowohl die Aktivierung der JNK⁴ blockieren als auch die Expression pro- und antiapoptotischer Proteine induzieren (Abb. 1.2). Die starke Vernetzung zwischen apoptotischen und antiapoptotischen Signalwegen verdeutlicht die Komplexität der TNF vermittelten Signaltransduktion.

⁴ engl. *c-Jun NH₂-terminal kinase*

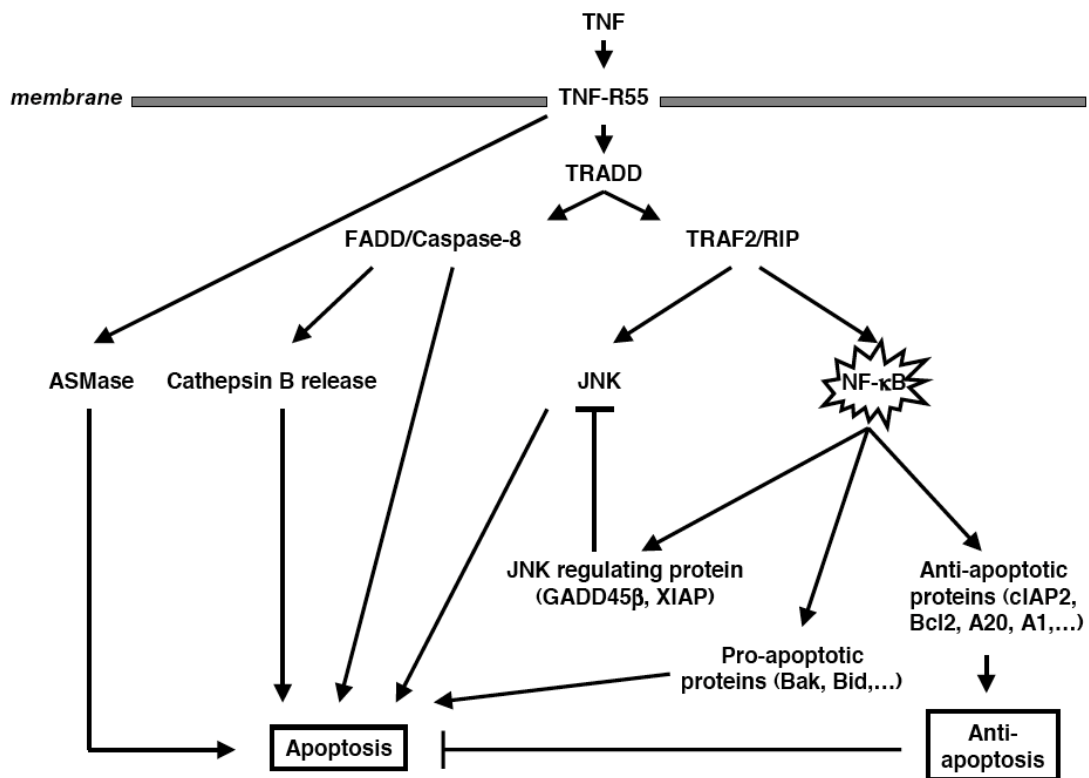


Abb. 1.2 Schematische Darstellung der TNF vermittelten Apoptose-Signalwege in Hepatozyten (Heyninck et al., 2003)

2. Der Transkriptionsfaktor *Peroxisome Proliferator-activated receptor-gamma*

2.1 Die *Peroxisome proliferator-activated receptor*-Familie nukleärer Rezeptoren

Die Komplexität der Zellen mit ihren vernetzten Signalwegen erfordert es, endogene wie exogene Signale richtig zu erkennen und angemessen darauf zu reagieren. Verschiedene Hormone dienen hierbei als Mediatoren, die über ihre Rezeptoren definierte Antworten in Form von genetischen, epigenetischen, sowie biochemischen Ereignissen in den Zielgeweben bzw. Zielzellen induzieren.

Die Regulation des Lipidstoffwechsels ist hierbei eng mit den nukleären Hormonrezeptoren der *Peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR)-Familie assoziiert (Kliwer et al., 1992; Lemberger et al., 1996; Mangelsdorf et al., 1995).

1990 wurde der erste Rezeptor identifiziert, an den Peroxisomen Proliferatoren binden und als PPAR α bezeichnet (Issemann and Green, 1990). Kurze Zeit später wurden zwei weitere Isoformen, PPAR β/δ und PPAR γ , identifiziert (Dreyer et al., 1992). Diese drei Isotypen weisen, ihrer biologischen Funktion entsprechend, verschiedene Verteilungsmuster im Gewebe auf (Desvergne and Wahli, 1999; Willson et al., 2001). Auf molekularer Ebene ist allen eine zentrale DNA-Bindungs-Domäne, die bestimmte DNA-Sequenzen in der Promotorregion von Zielgenen erkennt, gemein. Diese Sequenzen werden als PPAR-*response elements* (PPREs) bezeichnet (Dreyer et al., 1992; Tugwood et al., 1992). PPARs bilden Heterodimere mit anderen Mitgliedern der Zellkern-Rezeptor-Superfamilie, wie dem Retinoid X Rezeptor (RXR), was die Bindung an PPREs ermöglicht. Durch die Heterodimerisierung der RXR mit anderen nukleären Rezeptoren, wird zudem eine weitere Ebene der Regulation geschaffen. Die dadurch entstehende Konkurrenz beeinflusst zusätzlich die transkriptionelle Steuerung durch PPARs (Lemberger et al., 1996). Des Weiteren wirkt sich die Rekrutierung eines Proteinkomplexes, der aus Koaktivatoren oder Korepressoren besteht, auf den funktionellen Status der PPARs aus, was die Komplexität dieser Transkriptionsregulation verdeutlicht (Zhu et al., 1996; Zhu et al., 1997).

2.2 Aufbau von PPAR γ

Die Struktur des PPAR γ -Proteins ist typisch für nukleäre Hormon-Rezeptoren (Abb. I.3A). Zentral befindet sich die hochkonservierte DNA-Bindungs-Domäne (DBD⁵). Sie enthält zwei Zinkfinger Domänen, die an spezifische DNA-Sequenzen binden können. Im C-terminalen Bereich erfolgt die Bildung des Heterodimers. Außerdem bildet dieser Bereich eine Tasche mit zahlreichen hydrophoben Resten, in der spezifische Liganden binden (LBD⁶). Die Kristallstruktur in Abb. I.3B veranschaulicht den Komplex der Ligandenbindungsdomäne des humanen PPAR γ mit dem synthetischen PPAR γ Liganden Pioglitazon. Zusätzlich beinhaltet der C-Terminus die für die Aktivierung notwendige AF⁷-Domäne. An sie binden ligandenabhängig

⁵ engl. *DNA-binding site*

⁶ engl. *ligand-binding domain*

⁷ engl. *activation function*

Koaktivator-Proteine (Tontonoz and Spiegelman, 2008). Im N-terminalen Bereich des PPAR γ -Proteins, findet sich eine zusätzliche ligandenunabhängige Aktivierungsdomäne (AF1), die wichtige regulatorische Funktionen besitzt.

Neben der N-terminalen und C-terminalen Aktivierungsdomäne, konnten in PPAR γ noch regulatorische Phosphorylierungsstellen nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von PPAR γ über die Phosphorylierung eines Serins (Ser112) im N-Terminus durch die MAPK⁸ deutlich herabgesetzt wird (Adams et al., 1997; Hu et al., 1996).

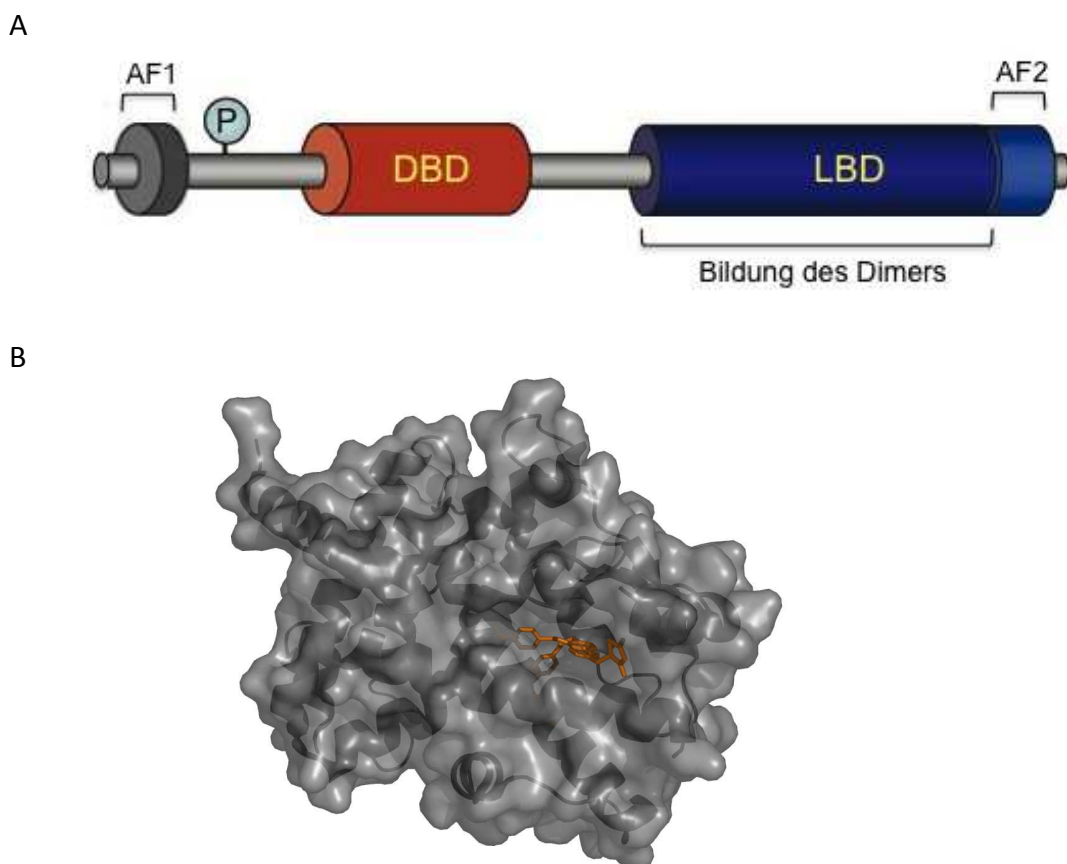


Abb.1.3 Domänenstruktur und Kristallstruktur der Ligandenbindungsdomäne von PPAR γ

A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur von PPAR γ (leicht verändert nach (Tontonoz and Spiegelman, 2008)). N-terminal befindet sich die schwache, ligand-unabhängige Aktivierungsdomäne 1 (AF1), gefolgt von der Phosphorylierungsstelle. Zentral liegt die DNA-Bindungs-Domäne (DBD). Das Carboxyterminale Ende besteht aus der Ligandenbindungsdomäne (LBD), über die auch die Heterodimerisierung erfolgt, sowie der ligandenabhängigen Aktivierungsdomäne (AF2). B) Die Kristallstruktur der Ligandenbindungsdomäne des humanen PPAR γ im Komplex mit dem Agonisten Pioglitazon (orange), (Datenbank: PDB, Eintrag: 2XKW).

⁸ engl. *mitogen-activated protein kinase*

2.3 Die Funktion des Transkriptionsfaktors PPAR γ

Ursprünglich wurde PPAR γ als Regulator der Differenzierung von Adipozyten beschrieben (Tontonoz et al., 1994). PPAR γ reguliert die Adipogenese und ist in eine Vielzahl biochemischer Prozesse involviert. Dazu zählen unter anderem die Förderung der Zelldifferenzierung, Steuerung des Lipidstoffwechsels und die Sensibilisierung gegenüber Insulin (Chawla et al., 1994; Desvergne and Wahli, 1999). Die Insulinresistenz wird als wesentlicher, pathogener Faktor in der Entstehung des Diabetes mellitus Typ II angesehen. Der Umstand, dass PPAR γ Einfluss auf den Insulinstoffwechsel hat, machte PPAR γ demnach zu einem therapeutischen Angriffspunkt und ermöglichte es, synthetische PPAR γ Liganden herzustellen, die bereits erfolgreich in der Behandlung von Patienten mit Diabetes mellitus Typ II eingesetzt werden (Auwerx, 1999).

In jüngerer Zeit rückte jedoch die immunmodulatorische Wirkung von PPAR γ in den Mittelpunkt des Forschungsinteresses.

2.3.1 PPAR γ und angeborene Immunität

Das Immunsystem ermöglicht es Organismen sich vor eindringenden Pathogenen wie Viren, Bakterien oder Pilzen sowie gegen körpereigene entartete Zellen (Krebszellen) zu schützen. Dabei wird zwischen dem angeborenen (innaten) und dem erworbenen (adaptiven) Immunsystem unterschieden. Das angeborene Immunsystem bildet die erste Linie der Verteidigung des Organismus gegen eindringende pathogene Mikroorganismen. Es umfasst verschiedene Komponenten. Die erste anatomische und physiologische Barriere bilden die Körperepithelien. Weitere Verteidigungsmechanismen der unspezifischen Immunantwort sind die zellvermittelte Phagozytose, allgemein entzündliche Reaktionen und das Komplementsystem. Zellen des innaten Immunsystems sind professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC⁹) wie Gewebsmakrophagen und dendritische Zellen (DC¹⁰), sowie neutrophile Granulozyten

⁹ engl. *antigen-presenting cell*

¹⁰ engl. *dendritic cell*

und natürliche Killerzellen (NK¹¹ Zellen). Sie exprimieren Mustererkennungsrezeptoren (PRR), die hochkonservierte molekulare Merkmale der Infektionserreger, die sogenannten Pathogen-assoziierten molekularen Muster (PAMP¹²), erkennen (Janeway and Medzhitov, 2002). Zu diesen Rezeptoren zählen auch die *toll-like*-Rezeptoren (TLR), deren Aktivierung zu einer schnellen Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine führt. Bislang wurden in Säugern 13 TLRs identifiziert, die auf der Zelloberfläche oder in endosomalen Kompartimenten exprimiert werden (Baccala et al., 2007). An die Oberflächen-TLRs 1, 2, 4, 5, 6 und 11 binden Lipide, Lipoproteine oder Peptidoglykane, die Bestandteil von Bakterien, Pilzen und Protozoen sind. Die intrazellulären TLRs 3, 7, 8 und 9 werden durch virale oder bakterielle Nukleinsäuren aktiviert. Spezifische Liganden für TLR 10, 12 und 13 wurden bisher nicht identifiziert. Einer der prominentesten TLR Liganden ist Lipopolysaccharid (LPS), ein Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien wie *Escherichia coli*. LPS assoziiert mit dem LPS-Bindungsprotein (LBP) und bindet an einen Rezeptorkomplex aus TLR4, CD14 und MD-2. Die Signaltransduktion erfolgt über die intrazelluläre TIR¹³-Domäne des TLR4 und aktiviert MyD88¹⁴- oder TRIF¹⁵-abhängige Signalwege (Abb. 1.4). MyD88 ist in den meisten TLR-Signalwegen ein wichtiges Adaptermolekül (Akira, 2006). Es rekrutiert weitere Proteine unter anderem TAK1¹⁶, was letztendlich über die Phosphorylierung des IKK¹⁷-Komplexes zur Translokation von NFκB¹⁸ und der Transkription proinflammatorischer Gene führt. Zusätzlich reguliert TAK1 den MAPK Signalweg und resultiert in der Aktivierung von AP1¹⁹. TRIF interagiert ebenfalls mit TAK1 und aktiviert NFκB und AP1. Parallel dazu induziert TRIF die Expression von Interferonen durch die Aktivierung des Interferon regulatorischen Faktors 3 (IRF3) (Fitzgerald et al., 2003).

¹¹ engl. *natural killer cell*

¹² engl. *pathogen-associated molecular pattern*

¹³ engl. *Toll/IL1 receptor*

¹⁴ engl. *myeloid differentiation factor 88*

¹⁵ engl. *TIR domain-containing adaptor inducing interferons*

¹⁶ engl. *TGFβ-activated protein kinase 1*

¹⁷ engl. *inhibitor of NFκB kinase*

¹⁸ engl. *nuclear factor κ B*

¹⁹ engl. *activator protein 1*

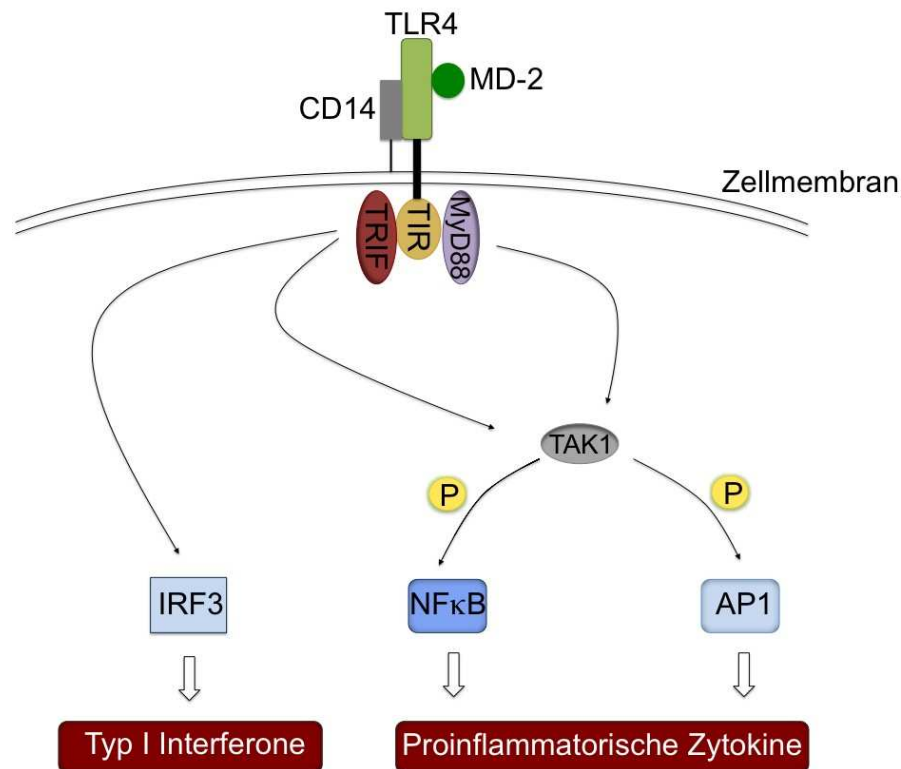


Abb. I.4 Vereinfachte Darstellung des Signaltransduktionsweges des TLR4

Suppression der Aktivierung von Makrophagen durch PPAR γ

Makrophagen zählen vermutlich zu den phylogenetisch ältesten Zellen des innate Immunsystems. Sie besitzen neben Phagozytose, intra- und extrazellulärem *Killing* die Fähigkeit Antigene für T Helferzellen über MHC²⁰ Klasse II Moleküle zu präsentieren. Sie differenzieren aus im Blut zirkulierenden Monozyten. Kommen Monozyten in Kontakt mit Infektionserregern, wandern sie in das betroffene Gewebe ein und differenzieren zu gewebsspezifischen Makrophagen. Dabei sezernieren sie eine Vielzahl verschiedener Faktoren, die sowohl antiinflammatorische als auch proinflammatorische Effekte aufweisen können.

Zahlreiche Studien belegen die antiinflammatorische Wirkung der PPAR γ -Aktivierung in Monozyten und Makrophagen. So konnte beispielsweise die PPAR γ vermittelte Inhibition von LPS oder IFN γ induzierten inflammatorischen Genen wie iNOS²¹, MMP9²² oder COX2²³ (Ricote et al., 1998; Welch et al., 2003), sowie die Reduktion der

²⁰ engl. *major histokompatibility complex*

²¹ engl. *inducible nitric oxide synthase*

²² engl. *matrix metalloproteinase*

Ausschüttung inflammatorischer Zytokine wie TNF, IL6, IL1 β und IL12 gezeigt werden (Alleve et al., 2002; Chung et al., 2000; Jiang et al., 1998; Straus et al., 2000). Neben des reprimierenden Effektes von PPAR γ auf die Transkription proinflammatorischer Gene, vermittelt PPAR γ durch die Induktion der IL10 Sekretion eine protektive Funktion in der Lunge (Kim et al., 2005).

2.3.2 PPAR γ und adaptive Immunität

Das spezifische (adaptive) Immunsystem steht in enger Koordination mit den angeborenen (innaten) Verteidigungsmechanismen, wobei dendritische Zellen als Bindeglied zwischen diesen beiden Mechanismen stehen. Das adaptive Immunsystem zeichnet sich durch seine hohe Variabilität aus, die durch ein breites Spektrum spezifischer Antigenrezeptoren und Antikörper gewährleistet wird. Nach einer Infektion bildet das adaptive Immunsystem ein Gedächtnis aus. Die Zellen der spezifischen Verteidigung sind T und B Lymphozyten. T Zellen vermitteln die zelluläre Immunität. Man unterscheidet dabei die Helferzellen, die das CD4 Molekül auf ihrer Oberfläche tragen von den zytotoxischen CD8 exprimierenden Zellen. B Lymphozyten vermitteln die humorale Immunität, indem sie spezifische Antikörper gegen eindringende Krankheitserreger sezernieren. Zytokine und regulatorische T Zellen gewährleisten eine adäquate Reaktion und das Abschalten nach erfolgter Immunantwort.

Aktuelle Forschungsdaten verweisen auf die regulatorische Funktion von PPAR γ in der adaptiven Immunantwort. So kann sich eine verminderte Expression dieses Rezeptors negativ auf die effiziente Steuerung der spezifischen Abwehr auswirken oder sogar autoimmune Erkrankungen verschlimmern (Daynes and Jones, 2002). Die Funktion von PPAR γ in unterschiedlichen Zellpopulationen des adaptiven Immunsystems wird im Folgenden beispielhaft dargestellt.

²³ engl. *cyclooxygenase 2*

Die Bedeutung von PPAR γ in dendritischen Zellen

Unreife DC nehmen durch Makropinozytose ständig Substanzen aus ihrer Umgebung auf. Werden sie durch Krankheitserreger aktiviert, wandern sie in benachbarte Lymphgewebe ein und präsentieren dort naiven T Zellen die Antigene (Steinman et al., 1997). Dieses geschieht über Bindung der Antigene an MHC Klasse I oder MHC Klasse II Moleküle. Klassischerweise werden intrazelluläre Antigene über MHC Klasse I Moleküle CD8 positiven T Zellen präsentiert, extrazelluläre Antigene hingegen über MHC Klasse II CD4 positiven T Zellen (Mellman et al., 1998). Eine Kombination dieser beiden Präsentationswege bildet die Kreuzpräsentation. Dabei werden prozessierte Proteine aus dem extrazellulären Raum an MHC Klasse I Moleküle gebunden und an naive CD8 T Zellen präsentiert. Dieses ist für die Aktivierung zytotoxischer T Zellen zur Abwehr gegen virusinfizierte oder entartete, körpereigene Zellen von zentraler Bedeutung (Heath et al., 2004). Parallel zur Antigenpräsentation exprimieren reife DC große Mengen kostimulatorischer Moleküle, wie CD80 und CD86 sowie CD40. Diese kostimulatorische Interaktion mit T Zellen ist essentiell für deren Differenzierung.

Die Aktivierung von PPAR γ beeinflusst die immunstimulatorische Funktion von LPS- oder CD40-aktivierten humanen DC (Gosset et al., 2001). Im Einzelnen wurde gezeigt, dass die Oberflächenexpression des *Scavenger* Rezeptors CD36 und des Kostimulators CD86 durch die Bindung spezifischer PPAR γ Liganden gesteigert wird, die Synthese von CD80 hingegen herunter reguliert wird. Des Weiteren führt eine Aktivierung von PPAR γ zu verminderter Sekretion des T_H1-induzierenden Faktors IL12 (Faveeuw et al., 2000).

Diese phänotypischen Änderungen und das veränderte Sekretionsmuster von DC kann auch Einfluss auf die Differenzierung von Effektor T Zellen nehmen. PPAR γ -aktivierte, murine DC sind in ihrer Fähigkeit naive T Zellen zu aktivieren gehemmt. Zudem führt die Abwesenheit von PPAR γ in DC zu einer gesteigerten Immunogenität (Szatmari et al., 2006). Dieses wurde durch die Beobachtungen untermauert, dass PPAR γ -aktivierte DC CD4 T Zell Anergie induzieren, was sich in einer verminderten Expression von T_H1- und T_H2-Zytokinen äußert. Außerdem ist die klonale Expansion der T Zellen nach Restimulation beeinträchtigt (Klotz et al., 2007).

Effekt der PPAR γ Aktivierung in T Zellen

Die vollständige Differenzierung naiver T Zellen in Effektor T Zellen benötigt 3 Signale (Curtsinger et al., 2003a; Curtsinger et al., 2003b). Signal 1 liefert die Antigenerkennung durch den T Zell Rezeptor (TCR²⁴). Die Interaktion des CD28 Rezeptors der T Zellen mit den kostimulatorischen Molekülen CD80/86 auf antigen präsentierenden Zellen (APC) bildet das zweite Signal. Diese Kostimulation induziert Proliferation und Zytokinsekretion der T Zelle (Carreno and Collins, 2002). Erhalten naive T Zellen ausschließlich Signal 1, werden sie tolerant bzw. anerg (Schwartz, 1996, 1997). Terminal differenzierte DC produzieren nach TCR-Stimulation große Mengen an IL12 oder Typ I Interferonen, und stellen damit das dritte Signal bereit (Curtsinger et al., 1999; Trinchieri et al., 2003). Sowohl naive, als auch aktivierte T Zellen exprimieren PPAR γ und die Bindung spezifischer Agonisten führt zu verminderter Proliferation und Viabilität der T-Lymphozyten (Harris and Phipps, 2001). Zudem wird die IL2 und IFN γ Produktion aktivierter T Zellen durch PPAR γ negativ beeinflusst (Clark et al., 2000; Cunard et al., 2004).

Auch die Differenzierung von T_H17 Zellen wird durch PPAR γ beeinflusst. Die Aktivierung von PPAR γ in CD4 T Zellen verhindert selektiv die Differenzierung zu T_H17 Zellen, indem die Expression des Transkriptionsfaktors ROR γ ²⁵ inhibiert wird (Klotz et al., 2009a). Die Differenzierung zu T_H1, T_H2 oder regulatorischen T Zellen wird dagegen nicht beeinträchtigt.

2.4 Regulation der PPAR γ -Aktivität

Welche Mechanismen der Steuerung der Genexpression durch PPAR γ zugrunde liegen und wie die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren oder Signalwegen abläuft ist bisweilen nicht vollständig geklärt und wird im Augenblick noch kontrovers diskutiert. In diesem Abschnitt wird ein Überblick über die wichtigsten transkriptionellen Regulationen von PPAR γ beispielhaft dargestellt.

Die regulatorische Funktion von PPAR γ im Lipidmetabolismus und der Glukosehomöostase beruht maßgeblich darauf die Transkription entsprechender Gene zu stimulieren (Abb.1.5). Die Aktivierung von PPAR γ ist ein mehrstufiger Prozess, in

²⁴ engl. *T cell receptor*

²⁵ engl. *retinoid-related orphan receptor γ*

dem zunächst die Bindung intrazellulärer oder extrazellulärer Liganden nötig ist. Die ligandeninduzierten Konformationsänderungen begünstigen die Bildung des obligatorischen Heterodimers mit dem RXR, wobei dieser dabei ebenfalls in der ligandengebundenen Konformation vorliegt. Im Folgenden wird ein aus Koaktivatoren bestehender Molekülkomplex rekrutiert, der es dem Gesamtkomplex ermöglicht durch die Bindung an spezifische DNA-Sequenzen (PPRE) innerhalb von Promotorregionen die Induktion der Zielgene zu starten (A et al., 1997; Krey et al., 1993). Da die Aktivierung der Transkription indirekt über die Koaktivatoren gesteuert wird, bezeichnet man diese Form der Genregulation als Transaktivierung. Auf diese Art greift PPAR γ positiv in die Regulation des Netzwerkes ein, welches metabolischen Abläufen zugrunde liegt.

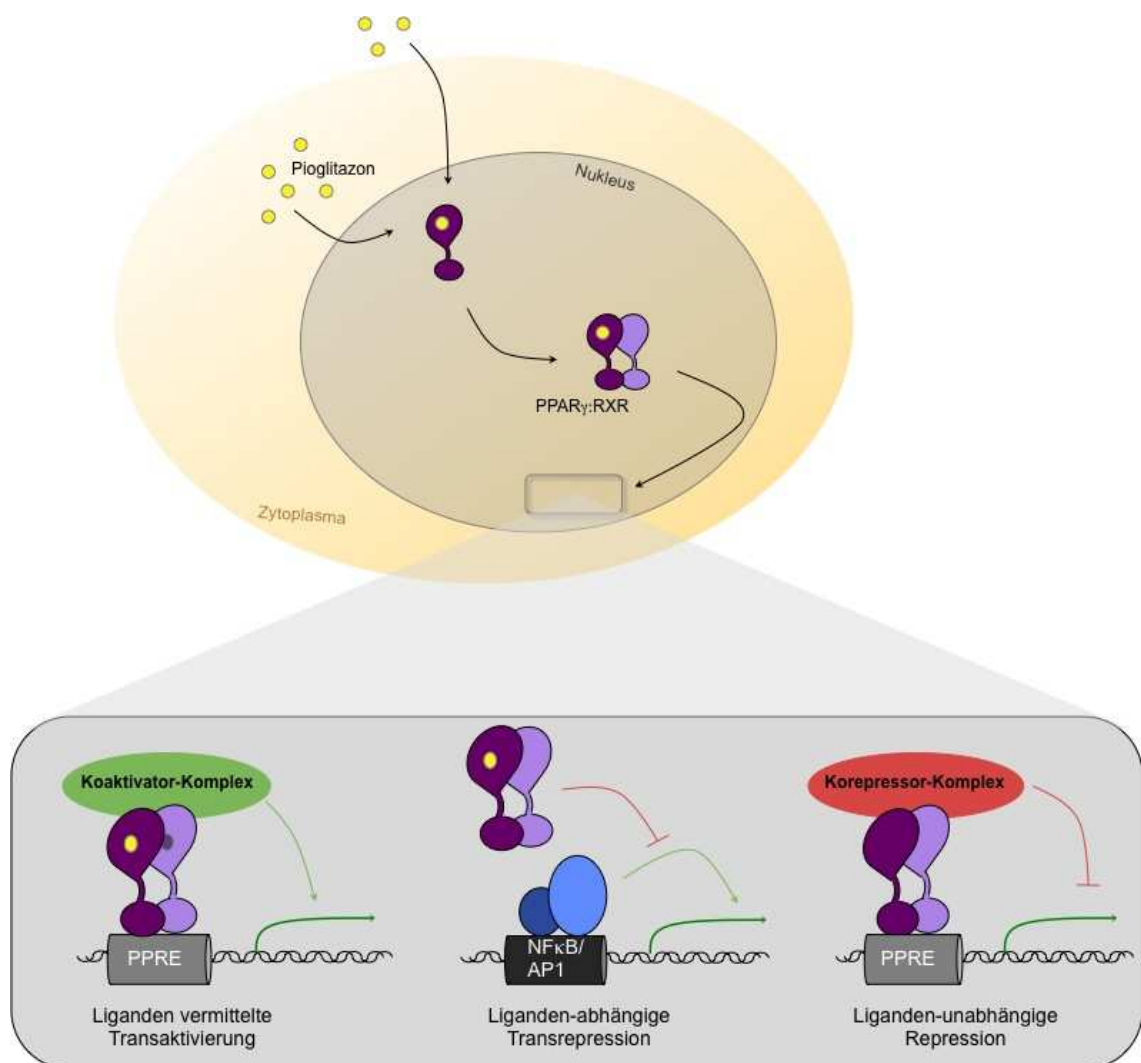


Abb.I.5 Regulation der Gentranskription durch PPAR γ

PPAR γ kann die Genexpression sowohl aktivieren als auch inhibieren. Bei der Liganden vermittelten Transaktivierung bildet PPAR γ ein Heterodimer mit dem RXR. Die Bindung spezifischer Agonisten begünstigt die Rekrutierung von Koaktivatoren, welche die Interaktion mit *Response*-Elementen der Promotorregion (PPRE) fördern und die Gentranskription induzieren. Durch Transrepression wird die Aktivität anderer Transkriptionsfaktoren verhindert. Dieser Vorgang basiert ebenfalls auf der Interaktion mit Liganden. Im Gegensatz dazu findet die Hemmung der Transkription durch Korepressoren in Abwesenheit spezifischer Agonisten statt. Der Komplex aus reprimierenden Molekülen wirkt der Aktivität von Koaktivatoren entgegen und erhält den „ruhenden“ Status der Gene aufrecht.

Die entzündungshemmenden Eigenschaften dieses Transkriptionsfaktors basieren auf der Repression proinflammatorischer Gene (Abb.I.5) (Jiang et al., 1998; Marx et al., 1998; Ricote et al., 1998). Im Falle der ebenfalls durch Liganden gesteuerten Transrepression erfolgt aber keine direkte DNA-Bindung des PPAR γ :RXR Heterodimers. Vielmehr besitzt die Aktivierung von PPAR γ einen antagonistischen Effekt auf die Induktion proinflammatorischer Gene durch die Inhibition anderer Transkriptionsfaktoren, wie NF κ B oder AP1. Sind keine spezifischen Liganden vorhanden, ändert sich die Konformation des Heterodimers aus PPAR γ und RXR dahingehend, dass die Bindung eines Korepressor-Komplexes begünstigt wird. Dieser Molekülkomplex blockiert ebenfalls die Transkription von Zielgenen.

2.5 PPAR γ Liganden

Die vielfältigen Funktionen von PPAR γ als Transkriptionsfaktor, sowie die Inhibition der Expression proinflammatorischer Gene, ermöglicht ein Eingreifen in verschiedene Signaltransduktionsprozesse. Dieses erfordert unterschiedliche Agonisten, welche die PPAR γ -Aktivität spezifisch regulieren können. Man unterscheidet zwischen natürlich vorkommenden, physiologischen Liganden und synthetischen Liganden, die im Folgenden näher beschrieben werden sollen.

PPAR γ beeinflusst den Lipidstoffwechsel und sowohl gesättigte als auch ungesättigte Fettsäuren können an PPAR γ binden und diesen aktivieren (Xu et al., 1999). Eine weitere Gruppe endogener PPAR γ -Agonisten bilden die Eicosanoide, welche aus dem Metabolismus der Arachidonsäure resultieren und eine Rolle bei

Entzündungsreaktionen spielen. Zu diesen gehört das 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂), ein Prostaglandinderivat, welches PPAR γ sehr effizient aktivieren kann (Forman et al., 1995; Kliewer et al., 1995; Yu et al., 1995). Weitere Vertreter sind die Hydroxyoctadecadienoidsäuren 9-HODE und 13-HODE, die zur 12/15-Lipoxygenase Familie der Eicosanoide gehören (Abb. I.6) (Conrad et al., 1992; Huang et al., 1999). Sie sind Bestandteil von oxidiertem „*low-density*“ Lipoprotein (oxLDL), das in Makrophagen für die Differenzierung von Schaumzellen und die Pathogenese der Arteriosklerose von zentraler Bedeutung ist (Nagy et al., 1998). Jüngere Studien ordnen auch nitrierten Fettsäuren, wie nitrierter Linolsäure oder nitrierter Ölsäure, eine Bedeutung als hocheffiziente PPAR γ -Aktivatoren zu (Baker et al., 2005; Freeman et al., 2008; Schopfer et al., 2005). Die Tatsache, dass Metabolite aus Entzündungsreaktionen als PPAR γ Agonisten fungieren, bestätigt die immunmodulatorische Funktion dieses Transkriptionsfaktors.

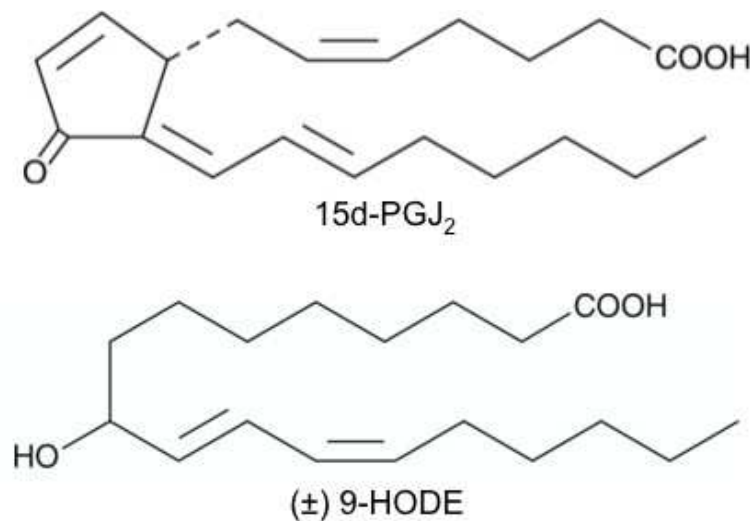


Abb. I.6 Strukturformeln ausgewählter endogener PPAR γ Liganden aus der Gruppe der Eicosanoide

Neben den natürlichen Liganden steht vor allem eine Gruppe synthetischer PPAR γ -Agonisten im Mittelpunkt des Interesses, die Thiazolidindione (TZDs). Diese auch Glitazone genannten blutzuckersenkenden Arzneimittel werden zur Therapie der bei Diabetes mellitus Typ 2 auftretenden Insulinresistenz verwendet (Hulin, 1994). Später

konnte gezeigt werden, dass TZD hoch affine PPAR γ -Agonisten sind (Lehmann et al., 1995), was sie zum Bestandteil zahlreicher Untersuchungen hinsichtlich ihrer antiinflammatorischen Wirkung machte. Zu den TZDs zählen Troglitazon (Rezulin[®]), Rosiglitazon (Avandia[®]) und Pioglitazon (Actos[®]), wobei in dieser Arbeit ausschließlich Pioglitazon zur selektiven PPAR γ Aktivierung genutzt wurde (Abb. 1.7).

Pioglitazon wird in der Leber durch Hydroxylierung der aliphatischen Methylengruppen metabolisiert. Dieses geschieht hauptsächlich durch Enzyme vom Typ Cytochrome P450. Hierdurch entstehen sechs Metabolite, von denen drei Metabolite (M-II, M-III und M-IV) pharmakologisch aktiv sind (Hanefeld, 2001).

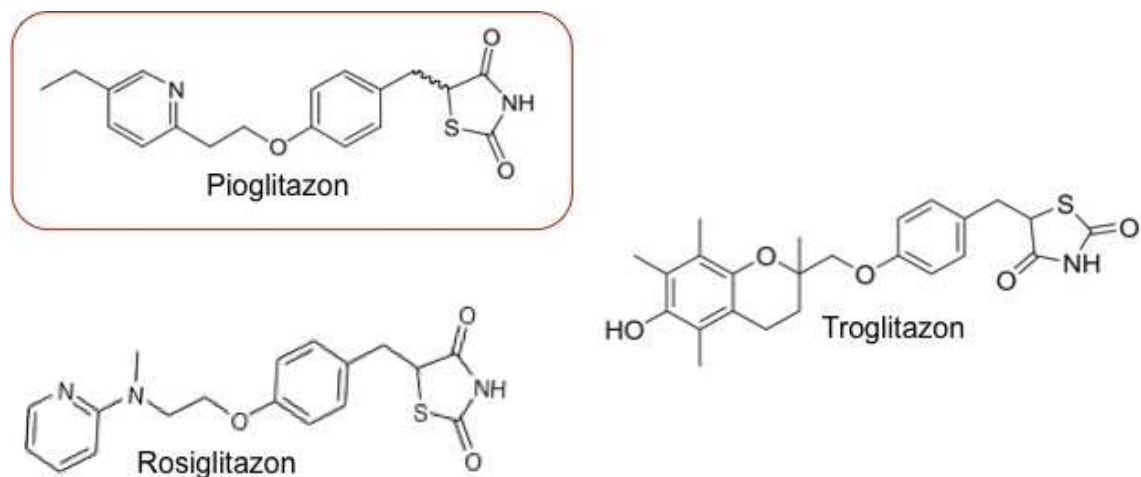


Abb 1.7 Die chemischen Strukturen ausgewählter Thiazolidindione

Exemplarisch sind die Strukturformeln von Pioglitazon, Troglitazon und Rosiglitazon dargestellt. Der allgemeine Aufbau weist die für Thiazolidindione namensgebende Thiazol-2,4-dion-Kopfgruppe auf. Der zentrale Aryl-Spacer ist über einen Linker an einen lipophilen Rest gebunden.

II. Ziel der Arbeit

Chronische Entzündungen der Leber können schwerwiegende Folgen wie Leberkrebs und Leberzirrhose nach sich ziehen. Deshalb steht die Entwicklung neuer pharmakologischer Therapieansätze zur Behandlung von Leberschäden im Fokus der medizinischen Forschung. In jüngster Zeit sind die antiinflammatorischen Eigenschaften des Transkriptionsfaktors PPAR γ eingehend untersucht worden. In Mausmodellen für Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes und des Zentralnervensystems, wie *inflammatory bowel disease* (IBD) und Multiple Sklerose (MS), konnte eine Verzögerung des Krankheitsverlaufs bereits gezeigt werden. Auch ließen sich in einigen Fällen die Folgen dieser Erkrankungen durch PPAR γ Aktivierung mildern.

Ziel dieser Arbeit war es, heraus zu finden, ob durch die systemische Administration des spezifischen, synthetischen PPAR γ Liganden Pioglitazon die immunvermittelte Leberschädigung beeinflusst werden kann. Folgende Fragestellungen sollten bearbeitet werden.

- Welche Wirkung zeigt die Pioglitazon induzierte PPAR γ Aktivierung auf die tolerogene Funktion antigenpräsentierender LSEC?
- Lässt sich die Entwicklung einer Hepatitis durch PPAR γ Aktivierung verhindern oder das Ausmaß der Leberschädigung lindern?
- Welchen Einfluss hat die PPAR γ Aktivierung auf die Zytokinexpression während einer Entzündungsreaktion in der Leber?

III. Material und Methoden

1. Material

1.1 Geräte

Analysewaagen	PT 600, CP 224 S-OCE, CD 2201 (Sartorius, Göttingen)
Autoklav	Belimed, Lautenschläger
AutoMACS	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Brutschränke	Hera cell, Hera cell 240 (Heraeus, Hanau)
Durchflusszytometer	Cantoll (Becton Dickinson, Heidelberg)
Eismaschine	Icematic, MF26 (Scotsman®, Frimont Bettolinc, Pogliano, Italien)
ELISA-Lesegerät	Spectro MAX 250 (Molecular Devices, MWG BIOTECH, Ebersberg)
Erlenmeyerkolben	50ml, 100ml, 250ml, 500ml (Schott, Mainz)
Gewindeflaschen	100ml, 250ml, 500ml, 1l, 2l (Schott, Mainz)
Heizblock	Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg)
Kühlschränke (+4°C)	Economic cooler (Bosch, Stuttgart) Liebherr premium, Liebherr comfort (Liebherr, Biberach)
Kühlschränke (-20°C)	Liebherr comfort (Liebherr, Biberach)
Kühlschränke (-80°C)	Hera freeze (Heraeus, Hanau)
Light Cycler	LightCycler® 480 II (Roche, Penzberg)
Magnetrührer	Heidolph MR 3002 (Heidolph Electro GmbH, Keilheim)
Messkolben	50ml, 100ml, 250ml, 500ml, 1l (Schott, Mainz)
Messzylinder	Rotilabo 50ml, 100ml, 500ml, 1l (Roth, Karlsruhe)
Mikroskop	DM IL (Leica, Wetzlar)
Mikrotiterplatten- Waschhilfe	Nunc-Immuno™ Wash12; Nunc Brand Products (Nalge Nunc International, via neoLab, Heidelberg)
Perfusionspumpe	Masterflex (Cole-Parmer Instrument Company via Novodirect, Kehl/Rhein)
pH-Meter	pH 523 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten (WTW), Weilheim)

Pipetten	0,2-2µl, 0,5-10µl, 2-20µl, 20-200µl, 200-1000µl (Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich) Transferpipette (Brand, Wertheim) HandyStep (Brand, Wertheim)
Pipettierhilfe	Matrix Technologies CellMate® (Thermo Scientific, USA)
Präparationsbesteck	Labotec, Labor-Technik, Göttingen
Reflexionsphotometer	scil Reflovet®Plus analyser (Roche, Penzberg)
Reinstwasseranlage	NANOpure Diamond, Barnstead (Werner Reinstwassersysteme, Leverkusen)
Rotoren	#6445 (Heraeus, Hanau); SW41 E3521 (Beckmann Coulter, Palo Alto, USA)
Schüttler	Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg)
Schüttelwasserbad	GFL® 1092 (GFL®, Burgwedel)
Siebe, Metall-	Universität Bonn, Abt. Feinmechanik
Spektralphotometer	Nanodrop ND-1000 (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
Thermocycler	TPersonal, Biometra (Göttingen)
Ultraturrax	IKA Werke, Staufen
Ultrazentrifuge	Optima™ LE-80K (Beckmann Coulter, Palo Alto, USA)
Vortexer	VWR Reagenzglasschüttler (VWR International GmbH, Darmstadt)
Wasserbäder	TW8 (Julabo, Seelbach)
Werkbank, steril	Hera safe (Heraeus, Hanau)
Zählkammer	Neubauer (La Fontaine über Labotec, Labor-Technik, Göttingen)
Zentrifugen	Multifuge 3s-r, Biofuge fresco (Heraeus, Hanau)

1.2 Verbrauchsmaterialien

ALT-Teststreifen	Reflotron®ALT (Roche, Penzberg)
Deckgläschen	21x46mm (Marienfeld, Lauda-Königshofen)
Einmalröhrchen	PP-Röhrchen 50ml steril, PP-Röhrchen 15ml steril (Greiner bio-one, Solingen)
FACS Röhrchen	Polystyren 12/75mm (BD, Heidelberg und Sarstedt, Nümbrecht)

Glaskanülen, heparinisiert	Mikro-HK-Kapillaren (Brand GmbH, Wertheim) Capilette for Reflotron 32 ^{II} (Selzer Labortechnik, Waghäusel)
Handschuhe, Einmal-Kanülen	DermaClean, Hygrip (Ansell, Brüssel, Belgien) 0,4x19mm 27G (grau), 0,5x22mm 25G (weiß), 0,6x25mm (blau) (BD Microlance, Heidelberg)
Messpipetten	2ml, 5ml, 10ml, 25ml (Greiner Labortechnik, Nürtingen)
Mikrotiterplatten	6- 24-, 96- Loch/Vertiefungen (Nunc, Wiesbaden; bio-one, Solingen; TPP, Trasadingen, Schweiz und Costar/Corning, USA)
Nylonwolle	Kisker GbR (über Labomedic GmbH)
OP-Masken	Foliodress [®] mask (Hartmann, Heidenheim)
Parafilm	Parafilm „M“ [®] (Amerikan National Can TM, Greenwich, USA)
Pasteurpipetten	150mm, 230mm (Roth, Karlsruhe)
Petrischalen	10cm (greiner bio-one, Solingen)
Pipettenspitzen	Standardtips 10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l (greiner bio-one, Solingen)
Polyamidsiebgewebe	„Gaze“ 40 μ m über Labomedic, Bonn
Reaktionsgefäße	0,5ml, 1,5ml, 2,0ml (Sarstedt, Nümbrecht)
Schlundsonde	(25mm) Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Skalpelle	Feather (Osaka, Japan)
Spritzen	2ml, 5ml, 10ml, 20ml BD Discardit TM II (BD, Heidelberg)
Sterilfilter	0,2 μ m (Schleicher&Schuell, Einbeck und BD, Heidelberg)
Zellkulturflaschen	25cm, 75cm (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz)
Zellkulturplatten	12-, 24-, 48-, 96-Loch/Vertiefungen (Nunc, Wiesbaden, Corning Bodenheim), 150x20mm (Sarstedt, Nümbrecht)
Zentrifugenbehälter	⁹ / ₁₆ x3 ¹ / ₂ (14x89mm), No. 344059 (Beckmann Coulter, Palo Alto, USA)

1.3 Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Applichem, Darmstadt
BCP (1-Bromo-3-chloropan)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
Carboxymethylcellulose	Sigma-Aldrich, Steinheim
CFSE / CFDA-SE	Molecular Probes, Leiden, Niederlande

Cl ₂ MBP- Liposomen	von Dr. Nico van Rooijen, Amsterdam
Concanavalin A	Sigma-Aldrich, Steinheim
DEPC Wasser	Invitrogen, Paisley, UK
DMEM-Medium	Gibco, BRL, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol, absolut	Applichem, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
Galaktosamin N	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin (200mM)	PAA, Pasching, Österreich
Heparin-Natrium-25000	Ratiopharm
HEPES	Roth, Karlsruhe
Lymphozyten-Separationsmedium	Nycomed Pharma, Unterschleiss-heim
2-Merkaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid (NaCl ₂)	Delta Select GmbH, Pfullingen
Nycodenz	Axis-Shield, Norwegen
Ovalbumin	Serva, Heidelberg
OVA Peptid ₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL), 80% HPLC rein	Pineda, Berlin
Paraformaldehyd (PFA)	Fluca, Buchs
PBS	Biochrom, Berlin
Penicillin (10.000 U/ml)/	
Streptomycin (10 mg/ml)	PAA, Pasching, Österreich
Pioglitazone (Actos)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Percoll	Amersham über GE Healthcare, Freiburg
RNAlater RNA Stabilization Reagenz	Qiagen, Hilden
RPMI 1640-Medium	Gibco BRL, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim
TMB	Thermo Scientific, Rockford, USA
TriReagent	Ambion, Austin, USA
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trizol	Invitrogen, Paisley, UK
Trypanblau	Serva, Heidelberg
Tween-20	Roth, Karlsruhe

1.4 Allgemeine Lösungen

1.4.1 Medien

LSEC-Medium	DMEM high Glucose (4500 mg/l) 10% (v/v) FCS 4mM L-Glutamin 10 ⁵ U Penicillin 0,1g/l Streptomycin
-------------	---

T Zell-Medium	RPMI 1640 8% (v/v) FCS 1% (v/v) 2-Merkaptoethanol 4mM L-Glutamin 10 ⁵ U Penicillin 0,1g/l Streptomycin
---------------	--

1.4.2 Puffer

ACK Lysepuffer	16,58g NH ₄ Cl 2g KHCO ₃ 74,4mg Na ₂ EDTA 2000ml H ₂ O pH 7,2-7,4
----------------	---

Bindungspuffer (ELISA)	0,1M Na ₂ HPO ₄ H ₂ O pH 9,0
------------------------	---

Blockierungspuffer (ELISA)	PBS 1% (w/v) BSA
----------------------------	---------------------

EDTA (0,5M)	186,1g EDTA ca. 20g NaOH 1000ml H ₂ O pH 7,8-8,0
-------------	--

FACS-Puffer	<p>PBS</p> <p>1% (v/v) FCS</p> <p>2mM EDTA</p>
GBSS	<p>137mm NaCl</p> <p>5mM KCl,</p> <p>1,6mM CaCl₂</p> <p>0,9mM MgCl₂</p> <p>0,3mM MgSO₄</p> <p>0,2mM KH₂PO₄</p> <p>1,7mM Na₂HPO₄</p> <p>2,7mM NaHCO₃</p> <p>5,5mM D(+)-Glukose</p> <p>50mM HEPES</p> <p>pH 7,4</p>
MACS-Puffer	<p>PBS</p> <p>1% (v/v) FCS</p> <p>2mM EDTA</p> <p>pH 7,2</p>
PBS (phosphate buffered saline)	<p>80g/l NaCl</p> <p>0,2g/l KCl</p> <p>1,44g/l NaHPO₄x 2H₂O</p> <p>0,2g/l KH₂PO₄</p> <p>pH 7,4</p> <p>(Biochrom, Berlin)</p>
Perfusionspuffer (Leber)	<p>0,01g L-Asparaginsäure</p> <p>0,02g L-Threonin</p> <p>0,03g L-Serin</p> <p>0,04g Glycin</p> <p>0,05g L-Alanin</p> <p>0,13g L-Glutaminsäure</p>

	0,13g L-Glutamin
	3,6g D-(+)-Glukose
	3,6g Fruktose
	67,4g Sukrose
	0,22g KCl
	0,1g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
	0,1g MgCl ₂ x 6 H ₂ O
	2,4g HEPES
	2,0g NaHCO ₃
	1000ml H ₂ O
	0,05% (v/v) Kollagenase
Perfusionspuffer (Milz)	GBSS
	0,5% (v/v) Kollagenase
Saponin-Puffer	FACS-Puffer
	0,5% (w/v) Saponin
TE-SDS-Puffer	H ₂ O
	100mM Tris/HCl, pH 8,0
	1mM EDTA, pH 8,0
	0,5% (w/v) SDS
	0,02 mg/ml Proteinase K
Trypanblaulösung	PBS
	10% (v/v) Trypanblau
Waschpuffer (ELISA)	PBS
	0,01% Tween20

1.5 Reaktionskits

Alle Reaktionskits werden nach Angaben des Herstellers verwendet.

Chemilumineszenz-Nachweiskit

für Meerrettich-Peroxidase

AppliChem GmbH, Darmstadt

Live/Dead® Fixable Violet dead cell stain Kit

Invitrogen, Karlsruhe

LightCycler® 480 DNA SYBR Green I Master

Roche, Penzberg

1.6 Antikörper

Folgende Antikörper gegen murine Epitope wurden verwendet. Diese wurden mit einem Fluorophor oder Chromophor (FITC, PE, PerCP-Cy5.5, APC, Alexa 647), biotinyliert oder unkonjugiert eingesetzt.

H-2K ^b	IgG2a κ, Ratte	AF6-88.5	anti-MHC I	BD
Isotyp	IgG1a κ, Ratte	Klon	Anmerkung	BD
Antigen	Isotyp			Firma
TNF B7-H1	IgG1a κ, Ratte IgG2a λ, Ratte	MP6-XT22 MH5	= CD274, PD-L1	BD eBioscience
CD3ε	IgG Hamster	145-2C11		BD
CD4	IgG2b κ, Ratte	GK1,5		eBioscience
CD8α	IgG2a κ, Ratte	53-6.7	= Ly-2	BD
CD11b	IgG2b κ, Ratte	M1/70		eBioscience
CD11c	IgG1, Hamster	HL3	= Integrin αX Kette	BD
CD16/32	IgG2b κ, Ratte	2.4G2	= anti-FcγR III + II	eigene Herstellung
CD25	IgG2b κ, Ratte	3C7	= IL2-Rezeptor αKette	BD
CD44	IgG2b κ, Ratte	IM7	= Pgp-1, Ly-24	BD
CD54	IgG1 κ, Hamster	3E2	= ICAM-1	BD
CD69	IgG1 Hamster	H1.2F3	=VEA	eBioscience
CD106	IgG2a κ, Ratte	429	= VCAM-1	BD
IFN-γ	IgG1 κ, Ratte	XMG1.2		BD
Ly6G	IgG2b κ, Ratte	RB6-8C5	= Gr-1	eBioscience
ME9F1	IgG2a, Ratte	ME9F1	anti-LSEC	eigene Herstellung
NK1.1	IgG2a κ, Maus	PK136	zur Depletion <i>in vivo</i> eingesetzt	eigene Herstellung
NK1.1	IgG2a κ, Maus	PK136		BD
Vα2 TCR	IgG2a λ, Ratte	B20.1	OT-1 TCR	BD
Vβ5 TCR	IgG1 κ, Maus	MR9-4	OT-1 TCR	BD

1.7 Antikörper-beschichtete magnetische Kügelchen (MACS-Beads)

anti-CD8 α (MACS)	Miltenyi, Bergisch Gladbach
anti-CD11c (MACS)	Miltenyi, Bergisch Gladbach
anti-CD19 (MACS)	Miltenyi, Bergisch Gladbach
anti-ME9F1 (MACS)	Miltenyi, Bergisch Gladbach
anti-CD3/anti-CD28	Invitrogen, Karlsruhe

1.8 Cytokine

Es wurden folgende murine, rekombinante Zytokine verwendet:

IL2, IL6, IL12, IFN γ	eBioscience
TNF	Invitrogen, Karlsruhe

1.9 Enzyme

Accutase	PAA, Pasching, Österreich
Kollagenase A	Sigma-Aldrich, Steinheim
Peroxidase	Pierce, Rockford, USA
Taq-Polymerase	Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm
Trypsin/EDTA	PAA, Pasching, Österreich

1.10 Fluoreszenzfarbstoffe und Fluorophorkonjugate

CFSE (CFDA-SE)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Hoechst	Sigma, Steinheim
BSA	- Alexa647 (Invitrogen, Karlsruhe)
LDL, acetyliert	- Alexa488 (Invitrogen, Karlsruhe)
OVA	- Alexa647 (Invitrogen, Karlsruhe)
Streptavidin	- FITC (PharMingen, Hamburg, BD, Heidelberg)
	- PE (PharMingen, Hamburg, BD, Heidelberg)
	- APC (PharMingen, Hamburg, BD, Heidelberg)

SYBR®safe DNA Gel stain Invitrogen, Karlsruhe
CountBright™
absolute counting beads - PerCPCy5.5 (Invitrogen, Karlsruhe)

1.11 TLR Liganden

TLR2 Pam₃Cys (EMC Microcollections, Tübingen)
TLR3 polyIC (InvivoGen, San Diego, USA)
TLR4 LPS (Sigma-Aldrich)
TLR7 9.2s RNA (biomers.net, Ulm)
TLR9 CpG 1668 (TIB Molbiol, Berlin)
Dotap Roth, Karlsruhe

1.12 Inhibitoren

Monensin eBioscience, San Diego, USA
BrefeldinA eBioscience, San Diego, USA

1.13 Primer

Name	Sequenz (5' → 3')
GAPDH-2 5'	GCA GTG GCA AAG TGG AGA TT
GAPDH-2 3'	TCT CCA TGG TGG TGA AGA CA
TNF α 5'	GAA TGG GTG TTC ATC CAT TCT
TNF α 3'	ACA TTC GAG GCT CCA GTG AAT TCG
IFN γ 5'	GAA CGC TAC AACTG CAT C
IFN γ 3'	GAG CTC ATT GAA TGC TTG G
IL10 5'	GTT ACT TGG GTT GCC AAG
IL10 3'	TTG ATC ATC ATG TAT GCT TC
IL6 5'	GCC TAT TGA AAA TTT CCT CTG
IL6 3'	GTT TGC CGA GTA GAT CTC
PPAR γ 5'	TGT AAT GGA AGG GCA AAA GG
PPAR γ 3'	TGG CTT CCA GTG CAT AAG TT
CD4 Cre 5'	CCC AAC CAA CAA GAG CTC AAG G
CD4 Cre 3'	CCC AGA AAT GCC AGA TTA CG

1.14 Zelllinien

B3Z	OVA ²⁵⁷⁻²⁶⁴ -spezifische T Zell Hybridomzelllinie
HEK ²⁶ 293	humane embryonale Nierenzelllinie zur Produktion rekombinanter Adenoviren (Graham et al., 1977)

1.15 Mauslinien

C57BL/6:	Inzuchtstamm mit dem MHC I-Haplotyp H2K ^b , aus eigener Zucht.
OT I x RAG:	CD8 T Zell transgene Mauslinie. H2K ^{bSIINFEKL} -restringierter V α 2V β 5 T Zell-Rezeptor, aus eigener Zucht (Hogquist et al., 1994).
TNFRI ^{-/-} :	p55 (CD120a) defiziente transgene Mauslinie, zur Verfügung gestellt von Gisa Tiegs

²⁶ engl. *human embryonic kidney*

PPAR $\gamma^{fl/fl}$:	Gefloxtes PPAR γ Gen (He et al.), zur Verfügung gestellt von Dr. Luisa Klotz
CD4 Cre:	Expression der Cre-Rekombinase unter Abhängigkeit des CD4 Promotors (Lee et al.), zur Verfügung gestellt von Dr. Luisa Klotz

Alle Versuchstiere wurden im „Haus für Experimentelle Therapie“ (HET) oder im IMMEI am Universitätsklinikum Bonn unter SPF- (engl. „*specific pathogen free*“) Konditionen gezüchtet und gehalten.

2. Methoden

2.1 Zellisolation

Für sämtliche Versuche wurden Mäuse im Alter von 6-14 Wochen verwendet. Zur Entnahme von Organen wurden die Versuchstiere durch Begasung mit CO₂ oder durch Fraktur der Halswirbelsäule getötet, der Körper mit 70% (v/v) Ethanol besprüht und anschließend die Leibeshöhle geöffnet.

2.1.1 Die Isolation von Zellpopulationen über magnetische Zellseparation (MACS)

Mit Hilfe der MACS-Technologie ist es möglich, einzelne Zellpopulationen anhand ihrer spezifisch exprimierten Oberflächenmoleküle von einem Zellgemisch zu trennen. Mit Antikörpern beschichtete magnetische Kügelchen (engl. *Microbeads*, \emptyset ca. 50nm) werden mit der Zellsuspension inkubiert und binden spezifisch an die Oberflächenmoleküle der gesuchten Zellpopulation. Danach wird die Suspension auf eine magnetische Säule gegeben, wodurch diejenigen Zellen in der Säule zurückgehalten werden, welche die *Microbeads* gebunden haben, die übrigen Zellen werden durch Waschen der Säule abgespült. Eluiert wird die gebundene Zellpopulation durch die Entfernung des magnetischen Feldes. Die Separation erfolgte am AutoMACS über das Programm „Pssel“ (Abkürzung für engl. „*positive selection*“). Es wurden CD8 T Zellen über anti-CD8 α *Microbeads*, CD11c⁺ DC über anti-CD11c *Microbeads*, B Zellen über anti-CD19 *Microbeads* und LSEC über anti-ME9F1 *Microbeads* aufgereinigt.

Material: AutoMACS, Gaze

Lösungen: MACS-Puffer

Methode: Die Zellen wurden in MACS-Puffer resuspendiert und mit *Microbeads* für 15Min. bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit MACS-Puffer gewaschen, in 3ml

MACS-Puffer aufgenommen, durch die Gaze filtriert und über den AutoMACS mit Hilfe des Programms „Possel“ sortiert.

2.1.2 Isolation primärer Zellen aus der Leber

Perfusion der Leber

Material: 25G Kanüle, Pumpe

Lösungen: Perfusionspuffer, 0,05% (w/v) Kollagenase A, GBSS

Methode: Nach Öffnen des Peritonealraums wurde die Pfortader (Vena porta) freigelegt und die Kanüle in diese eingeführt. Während der ca. 10 sekundigen Perfusion mit der Kollagenase A haltigen Perfusionslösung (Flussgeschwindigkeit: 4ml/Min.) wurde die untere Hohlvene (Vena cava inferior) durchtrennt, anschließend die Gallenblase aufgeschnitten, die Leber herauspräpariert und in ein Gefäß mit GBSS-Lösung überführt.

Isolation von LSEC aus der Leber

Material: Sieb (250µm), Auto MACS

Lösungen: GBSS, GBSS/4% (w/v) Kollagenase A, Nycodenz Gradient (30% w/v), MACS Puffer, anti-LSEC Beads, LSEC-Medium

Methode: Die mit Kollagenase A perfundierten Lebern wurden in einer Petrischale mit einer gekrümmten Schere ausgestrichen, in ein Röhrchen überführt und 20 Min. lang bei 37°C im Schüttelwasserbad bei 240 U/Min. in GBSS/4% Kollagenase verdaut. Die Suspension wurde anschließend durch ein Metallsieb gedrückt und mit GBSS gewaschen. Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:1,23 in Nycodenz resuspendiert (dieses entspricht einer Dichte von 1,089g/cm³), in ein 15ml Röhrchen transferiert und der Gradient bei 1400 x g und 20°C für 20 Min. ohne Bremse zentrifugiert. Durch diese Dichte-Zentrifugation werden die Parenchymzellen (Hepatozyten) von den anderen leberassoziierten Zellen getrennt. Anschließend wurde die Interphase abgenommen und in GBSS gewaschen.

Isolation leberassoziiertes Zellen

Material: Sieb (250µm),

Lösungen: GBSS/0,5% Kollagenase (v/v), ACK-Puffer, PBS, MACS-Puffer, T Zell-Medium

Methode: Nach Entnahme der Leber wurden diese in einer Petrischale mit einer gekrümmten Schere ausgestrichen, in ein Röhrchen überführt und 15 Min. lang bei 37°C im Schüttelwasserbad bei 240 U/Min. in GBSS/4% Kollagenase inkubiert. Anschließend wurden

die Zellen durch ein Sieb gedrückt, mit PBS gewaschen, das Zellpellet zur Lysis der Erythrozyten in 1ml ACK-Puffer resuspendiert und nach 1 Min. mit 30ml PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in T Zell Medium ausplattiert.

2.1.3 Isolation primärer Zellen aus Milz und Lymphknoten

Isolation von Lymphozyten über Nylonwolle

Material: Sieb (250 µm), Nylonwolle, 10 ml Spritze

Lösungen: PBS, T Zell Medium, MACS Puffer

Methode: Zum Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen wurde eine mit 0,6 g Nylonwolle gefüllte sterile 10 ml Spritze mit T Zell Medium für 45 Min. bei 37°C vorinkubiert. Milz, inguinale, axiale und mesenteriale Lymphknoten wurden aus OT I transgenen Mäusen entnommen, in ein Röhrchen mit PBS überführt und mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein Sieb gedrückt und zentrifugiert (350 x g, 10 Min., 20°C). Die Zellen wurden in 6 ml T Zell Medium resuspendiert und auf die Nylonwolle gegeben. Nach einer Inkubation bei 37°C im Brutschrank für 60 Min. wurde die Spritze mit 20 ml T Zell Medium gewaschen, der Durchlauf abzentrifugiert (350 x g, 10 Min., 20°C) und in MACS-Puffer resuspendiert. Die Isolation CD8 positiver T Zellen erfolgte durch die Verwendung von anti-CD8 *Microbeads* und eine positive Aufreinigung. Für die Isolation transgener CD8⁺ T Zellen aus OT I Mäusen, wurde den Tieren zur Depletion von NK und NKT Zellen 48 h vor der Organentnahme 300 µg NK1.1 Antikörper intra peritoneal (*i.p.*) injiziert.

Isolation von CD11c⁺ dendritischen Zellen

Material: Kanüle, Spritze, Sieb (250µm), AutoMACS

Lösungen: GBSS/0,5% Kollagenase (v/v), PBS, MACS-Puffer, T Zell-Medium

Methode: Die Milz wurde von Fettgewebe befreit und in GBSS Lösung überführt. Anschließend wurde diese mit 1,5 ml GBSS/0,5% Kollagenase (v/v) perfundiert, 20 Min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert und durch ein Sieb gedrückt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Danach wurden die Zellen in MACS-Puffer resuspendiert (pro 100x10⁶ Zellen 0,5 ml), mit CD11c *Beads* (pro 100x10⁶ Zellen 25 µl *Beads*) 15 Min. bei 4°C inkubiert, im Anschluss gewaschen und über den AutoMACS selektioniert. Von der positiven Fraktion wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen für die Kokultur verwendet.

Präparation B Zell depletierter Splenozyten

Material: Kanüle, Spritze, Sieb (250 µm), AutoMACS
Lösungen: GBSS/0,5 % Kollagenase (v/v), PBS, MACS-Puffer, T Zell Medium
Methode: Nach der Perfusion der Milz mit 1,5 ml GBSS/0,5% Kollagenase und der Inkubation für 20 Min. bei 37°C im Wasserbad wurden die Zellen über ein Sieb vereinzelt, gewaschen und zur Lyse von Erythrozyten in 1 ml ACK Puffer resuspendiert. Nach 1 Min. wurde die Reaktion mit PBS gestoppt und zentrifugiert (350 x g, 10 Min., 20°C). Die Zellen wurden in MACS-Puffer resuspendiert (je Milz 300 µl) und mit CD19 *Beads* (je Milz 30 µl *Beads*) 15 Min. bei 4°C inkubiert. Nach Selektion über den AutoMACS wurde die negative Fraktion in T Zell Medium aufgenommen, die Zellzahl bestimmt und ausplattiert.

Generierung aktivierter Lymphozyten

Material: Kanüle, Spritze, Sieb (250µm)
Lösungen: GBSS/0,5 % Kollagenase (v/v), PBS, MACS-Puffer, T Zell Medium, Lymphozyten-separationsmedium
Methode: Aktivierte OT I CD8⁺ T Zellen wurden aus Milzen von OT I x RAG^{-/-} Mäusen generiert. Hierfür wurde die Milz entnommen, mit GBSS/0,5 % Kollagenase perfundiert und 15 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Milz durch ein Sieb gedrückt, gewaschen und die Erythrozyten durch Inkubation mit 1 ml ACK Puffer für 1 Min. lysiert. Danach wurden die Zellen in T Zell Medium und 0,5 mg/ml OVA in eine 25 cm² Zellkulturflasche ausplattiert. Nach 42 Std. wurde die Zellsuspension unter Zugabe von frischem Medium und 20 U/ml IL2 in eine 75 cm² Kulturflasche überführt. Weitere 42 Std. später wurden die Zellen entnommen, zentrifugiert (350 x g, 10 Min., 20°C), in 4 ml T Zell Medium resuspendiert und mit 2 ml Lymphozytenseparationsmedium unterschichtet. Durch die Zentrifugation bei 2000 U/Min. für 10 Min. ohne Bremse konnten tote Zellen separiert werden. Die Interphase wurde schließlich entnommen, mit PBS gewaschen und die Zellzahl bestimmt.

2.2 Zellzahlbestimmung

Material: Neubauer Zählkammer
Lösungen: Trypanblau-Lösung (1:10 Verdünnung (v/v) der 0,4 % Stammlösung in PBS)
Methode: Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:10 mit Trypanblau-Lösung verdünnt, 10 µl in die Neubauer Zählkammer gegeben und die Zellen in den 16 kleinen Außenquadraten gezählt. Hierbei werden nur die lebenden, d.h. die nicht mit Trypanblau gefärbten Zellen, berücksichtigt. Daraus lässt sich dann die Zellzahl folgendermaßen berechnen:

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

2.3 Transfektion von LSEC

Material: 96-Loch Platte (Rundboden)

Lösungen: Dotap, LSEC-Medium

Methode: LSEC wurden 48 Std. nach ihrer Isolation verwendet. Für die Transfektion von CpG-Nukleotiden und 9.2s RNA wurde das liposomale Transfektionsreagenz Dotap verwendet. Dotap, welches kationisch ist, bildet Komplexe mit den negativ geladenen Liganden. Diese Komplexe gelangen später durch Endozytose in die Zelle und werden anschließend aus den Endosomen freigesetzt. Für die Transfektion wurde ein Verhältnis von Dotap zu Nukleinsäure von 3:1 verwendet. Dotap wurde mit PBS gemischt, für 5 Min. bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Transfektionslösung zu dem Liganden gegeben, für 20 Min. bei RT inkubiert, danach mit LSEC Medium gemischt und zu den LSEC gegeben.

2.4 Restimulation von T Zellen *ex vivo*

Material: 48-Loch Platte

Lösungen: T Zell-Medium, Monensin, BrefeldinA

Methode: Isolierte Milzzellen wurden B Zell depletiert, $0,5 \times 10^6$ Zellen in einer 48-Loch Platte ausplattiert und mit $5\mu\text{g/ml}$ ConA *in vitro* stimuliert. Nach 19 Std. wurden die Zellen weitere 5 Std. in Anwesenheit von Monensin und BrefeldinA inkubiert. Anschließend wurden die Zellen extra- und intrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

2.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS: engl. *fluorescence activated cell sorting*) ist eine Technik zur elektronischen Einzelzellanalyse großer Zellpopulationen und ermöglicht die Analyse ihrer Funktionen und wechselnder Funktionszustände. Aus einer Zellsuspension wird eine Serie feinsten Tröpfchen generiert, die jeweils nur eine Zelle enthalten. Dadurch kann nun jede Zelle einzeln an monochromatischen Lasern vorbei geführt werden (Argonlaser $\lambda = 488\text{nm}$, bzw. Helium-Neon Laser $\lambda = 635\text{nm}$). Photomultiplikatoren messen die Streuung des Laserlichts. Die Vorwärts-Lichtstreuung (engl. *forward scatter*, FCS), die in einem Winkel von $2-10^\circ$ erfolgt,

korreliert mit der Größe der Zellen. Licht, das in einem Winkel von 90° detektiert wurde, gibt Aufschluss über ihre Granularität (*engl.* sideward scatter, SSC). Die Elektronen von Fluoreszenzfarbstoffen werden durch Licht des Laserstrahles in einen kurzfristig angeregten Zustand versetzt. Daraufhin fallen die Elektronen wieder auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück und emittieren dabei Licht einer bestimmten Wellenlänge. Die Intensität der Fluoreszenz wird durch Photomultiplikatoren quantifiziert und da die Fluoreszenzfarbstoffe an Antikörper konjugiert sind, korreliert diese Fluoreszenzintensität mit der Antigendichte auf der Zelloberfläche.

Zur Analyse der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurde das Canto II verwendet (BD). Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm FlowJo (Tree Star Inc, Ashland, USA).

2.5.1 Markierung von Oberflächenantigenen

Zur Immunfluoreszenzmarkierung wurden direkt mit einem Fluorophor/Chromophor gekoppelte Antikörper verwendet.

Material: 96-Loch Platte (Rundboden)

Lösungen: FACS-Puffer

Methode: Zur Oberflächenfärbung wurden die Zellen in einer Konzentration von $1-5 \times 10^6$ /ml in FACS-Puffer resuspendiert und davon jeweils 100 µl in eine 96-Loch Platte zum Färben überführt. Die Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:100 bis 1:400 zu den Zellen gegeben und für 15 Min. bei 4°C inkubiert. Fcγ-Rezeptoren wurden durch Zugabe von 10 µl/ml anti-CD16/CD32 Antikörper (2.4G2) blockiert. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen (1600 U/Min., 2 Min., 4°C). Wurden biotinylierte Antikörper eingesetzt, so erfolgte im nächsten Schritt die Zugabe von Streptavidin-Konjugaten in einer Verdünnung von 1:200 bis 1:600 und einer Inkubationszeit von 15 Min. bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen nochmals gewaschen und durchflusszytometrisch analysiert. Um tote Zellen auszuschließen, wurde wenige Minuten vor der Analyse am Durchflusszytometer der Farbstoff Hoechst in einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugegeben.

2.5.2 Intrazelluläre Färbung von Antigenen

Material: 96-Loch Platte (Rundboden)

Lösungen: FACS-Puffer, Saponin-Puffer, 4% PFA,

Methode: Erfolgte zur Oberflächenfärbung zusätzlich eine Färbung intrazellulärer Antigene, so wurden nach der oben beschriebenen Oberflächenfärbung die Zellen mit 4 % PFA für 10 Min. auf Eis fixiert und anschließend mit FACS-Puffer gewaschen. Danach erfolgte die Permeabilisierung der Zellen durch einen Waschschrift und anschließender Inkubation in Saponin-Puffer für 10 Min. auf Eis. Danach wurden die in Saponin-Puffer verdünnten Antikörper zu den Zellen gegeben und für 30 Min. auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit Saponin-Puffer wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und durchflusszytometrisch analysiert.

2.5.3 Durchflusszytometrische Analyse der Zellproliferation

Um die Teilung von Zellen zu untersuchen, wurde der Fluoreszenzfarbstoff CFSE verwendet. Dieser kann die intakte Zellmembran passieren und wird intrazellulär von Esterasen gespalten, wobei reaktive Gruppen entstehen, die kovalent an bestimmte Aminosäuren intrazellulärer Proteine binden, so dass kein Austritt des Farbstoffs aus der Zelle mehr erfolgen kann. Bei jedem vollständigen Zellzyklus halbiert sich die Intensität des Farbstoffes. Diese Verdünnung lässt sich im Durchflusszytometer bei 488nm messen, so dass Rückschlüsse auf die Proliferation einzelner Zellen gezogen werden können.

Lösungen: PBS, T Zell-Medium

Methode: Die Färbung der Zellen erfolgte in PBS+1 μ M CFSE für 10-15 Min. bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von FCS in einer Endkonzentration von 4 % gestoppt, die Zellen dann in PBS gewaschen (350 x g, 10 Min., 20°C) und im Durchflusszytometer analysiert.

2.6 *In vitro* Kokultur und Analyse von T Zell-Funktionen

Lösungen: T Zell-Medium, Lymphozytenseparationsmedium, PBS

Methode: Die Interaktion zwischen CD8⁺ T Zellen und LSEC wurde in einer *in vitro* Kokultur analysiert. Dafür wurden LSEC in einer 24-Loch Platte kultiviert und 48 Std. nach deren Isolation mit verschiedenen Reagenzien stimuliert. Erfolgte die Kokultur mit OT I T Zellen, wurde OVA (0,1 mg/ml) zugegeben. Nach weiteren 24 Std. wurden LSEC mit 0,7 – 1x10⁶ transgenen CD8 T Zellen in 2 ml T Zell Medium kokultiviert. Zur Untersuchung der Proliferation wurden CD8 T Zellen vorher mit CFSE markiert (siehe oben). Nach drei Tagen Kokultur wurden die CFSE-markierten T Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Erfolgte keine CFSE-Markierung, wurden die T Zellen nach vier oder fünf Tagen von den LSEC abgenommen und

lebende Zellen über Lymphozytenseparationsmedium aufgereinigt. Hierfür wurden die T Zellen in 5 ml T Zell Medium resuspendiert und mit 2 ml Lymphozytenseparationsmedium unterschichtet. Nach der Dichte Zentrifugation (2000 U/Min., 10 Min, 20°C, ohne Bremse) wurde die Interphase abgenommen, die Zellen gewaschen und gezählt. Anschließend wurden 1×10^5 Zellen/200 μ l T Zell Medium auf vorher mit anti-CD3 ϵ Antikörpern beschichteten (10 μ g/ml in PBS für 1 Std. bei 37°C) 96-Loch Platten ausplattiert. Nach weiteren 16 Std. wurde der Überstand abgenommen und entweder bei -20°C gelagert oder mittels ELISA analysiert.

2.7 ELISA²⁷

Der ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren, um z.B. Proteine in Zellkulturüberständen zu quantifizieren. In dieser Arbeit wurde der „Sandwich“-ELISA verwendet, wobei zwei für das Protein spezifische Antikörper benötigt werden. Der erste Antikörper wird zunächst an die beschichtete Oberfläche einer 96-Loch Platte gebunden (Primärantikörper). Anschließend wird das Proteingemisch zugegeben, wobei das zu untersuchende Protein an den Antikörper bindet. Danach wird der zweite Antikörper zugegeben (Sekundärantikörper). Dieser bindet an ein nichtkompetitives zweites Epitop des Proteins und ist zusätzlich an Biotin gekoppelt. In einem nächsten Schritt wird das Streptavidin-konjugierte Enzym Peroxidase zugegeben. Streptavidin bindet an das Biotin am Sekundärantikörper, so dass nach Zugabe des Enzymsubstrats eine enzymatische Reaktion erfolgen kann. Dabei entsteht ein farblicher Niederschlag, welcher anhand seiner Lichtabsorption einer bestimmten Wellenlänge ($\lambda = 650\text{nm}$) quantitativ bestimmt werden kann, wobei die Absorption direkt mit der Menge an gebundenem Protein korreliert. Durch Vergleich der Menge mit einer Verdünnungsreihe des entsprechenden rekombinanten Zytokins mit bekannter Konzentration (Standard) kann die Konzentration des Proteins in dem Gemisch bestimmt werden.

Material: 96-Loch Platte (Flachboden; beschichtet)

Lösungen: Bindungspuffer, Blockierungspuffer, PBS, Waschpuffer

Methode: Die 96-Loch Mikrotiterplatten wurden zunächst 24 Std. bei 4°C mit dem Fängerantikörper (Primärantikörper), der in einer Konzentration von 1:500 in Bindungspuffer verdünnt wurde, beschichtet. Der Antikörper wurde im Folgenden verworfen, die Platte 3 x mit Waschpuffer gewaschen und anschließend 30 Min. bei RT mit Blockierungspuffer

²⁷ engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*

inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Platte abzusättigen. Danach wurde die Platte wiederholt gewaschen und die Proteinlösung bzw. der entsprechende Standard zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach wiederholtem Waschen wurde der Detektionsantikörper (Sekundärantikörper) für 1 Std. bei 37°C zugegeben (1:500 in PBS) und anschließend wieder gewaschen. Danach wurde die Platte bei Raumtemperatur für 30 Min. mit dem Streptavidin-Peroxidase Konjugat (1:1000 in PBS) inkubiert, anschließend gewaschen, die Substratlösung TMB zugegeben und der Farbumschlag des Substrates sofort im ELISA Auslesegerät analysiert.

2.8 Molekularbiologische Typisierung

Die Typisierung der Mauslinien erfolgte durch die DNA-Analyse aus Gewebe der Schwanzspitze.

2.8.1 DNA Präparation aus Gewebe

Material: Skalpell

Lösungen: TE-SDS-Puffer, Proteinase K (20mg/ml), Phenol/Chloroform, Ethanol (100%, 70%)

Methode: Die Schwanzspitze wurde mit Hilfe eines Skalpells abgetrennt und das Gewebe, in 500 µl TE-SDS-Puffer mit 5 µl Proteinase K über Nacht bei 57°C im Thermo-Schüttler lysiert. Die Extraktion der DNA erfolgte durch Zugabe von 500 µl Phenol/Chloroform. Nach Zentrifugation (13.000 U/Min., 5 Min., RT) wurde die wässrige, die Nukleinsäuren enthaltene Phase abgenommen. Anschließend wurde die DNA mit 500 µl eiskaltem Ethanol (100%) präzipitiert, erneut zentrifugiert (13.000 U/Min., 5 Min., RT), das Zellpellet mit Ethanol (70%) gewaschen und bei 62°C 5 Min. getrocknet. Zur Analyse wurde die DNA in 200 µl sterilem Wasser bei 62°C für 10 Min. gelöst.

2.8.2 PCR²⁸ Reaktion

Die PCR ist eine Methode zur Amplifikation von Nukleinsäuren, die es ermöglicht definierte Bereiche diverser DNA-Abschnitte exponentiell zu vervielfachen.

Material: PCR-Gerät

²⁸ engl. *polymerase chain reaction*

Lösungen: Genspezifische Primer, dNTP (25 mM), MgCl₂ (25 mM), 5x PCR-Puffer, Taq-Polymerase, TE-Puffer, 5x Probenpuffer

Methode: Für die PCR Reaktion wurde folgende Lösung bei 4°C angesetzt:

1 µl Primer-Mix (10 µM)

0,1 µl dNTP (10 mM)

2 µl MgCl₂ (25 mM)

4 µl 5x Puffer

10,5 µl H₂O

0,1 µl Taq-Polymerase

1- 2 µl DNA

Die PCR zur Amplifikation der PPAR γ -DNA wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

Verwendete Primer: **PPAR γ 5'** TGT AAT GGA AGG GCA AAA GG
PPAR γ 3' TGG CTT CCA GTG CAT AAG TT

1 Zyklus 95°C 5 Min.

39 Zyklen 94 °C 35 Sek.

60°C 40 Sek.

72°C 40 Sek.

1 Zyklus 72°C 5 Min.

4°C

Die PCR zur Typisierung der CD4 Cre⁺ Mäuse wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

Verwendete Primer: **CD4 Cre 5'** CCC AAC CAA CAA GAG CTC AAG G
CD4 Cre 3' CCC AGA AAT GCC AGA TTA CG

1 Zyklus 94°C 3 Min.

39 Zyklen 94 °C 30 Sek.

63°C 30 Sek.

72°C 20 Sek.

1 Zyklus 72°C 5 Min.

4°C

2.9 Quantifizierung intrahepatischer Zytokine

2.9.1 RNA-Aufreinigung aus Lebergewebe

Material: Ultraturrax, gestopfte Spitzen

Lösungen: RNAlater, TriReagent, BCP (1-Bromo-3-chloropropan), DEPC Wasser

Methode: Der Maus wurde Lebergewebe entnommen und in 37°C vorgewärmten RNAlater-Lösung gegeben. Dieses ermöglichte eine Lagerung des Gewebes bei 4°C bis zu 4 Wochen. Der RNAlater Puffer wurde abgenommen, 1 ml TriReagent pro 50-100 mg Gewebe zugegeben und das Gewebe mit dem Ultraturrax zerkleinert. Anschließend wurden die Proben 5 Min. bei RT inkubiert, zentrifugiert (13.000 U/Min., 15 Min, 4°C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 100 µl BCP und Inkubation bei RT für 10 Min. wurden die Proben erneut zentrifugiert (13.000 U/Min., 15 Min., 4°C). Weitere Arbeiten erfolgten nun ausschließlich mit gestopften Spitzen. Die wässrige Phase wurde abgenommen, 500 µl Isopropanol zugegeben, gemischt und nach 10 Min. Inkubation bei RT zentrifugiert (13.000 U/Min., 15 Min., 4°C). Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet mit 1 ml eiskaltem Ethanol zweimal gewaschen, zentrifugiert (10.000 U/Min., 5 Min., 4°C) und bei RT trocken gelassen. Schließlich wurde die RNA in 20-30 µl DEPC Wasser resuspendiert und bei -80°C gelagert.

2.9.2 Reverse Transkription

Für die Amplifikation von RNA ist es notwendig, diese zunächst in komplementäre DNA umzuschreiben. Dies geschieht mithilfe von RNA-abhängigen DNA-Polymerasen, sogenannten Reversen Transkriptasen.

Material: gestopfte Spitzen

Lösungen: SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit, Roche

Methode: Folgende Lösung wurde bei 4°C angesetzt:

4 µl 5x VILO Reaktions-Mix

2 µl 10x superscript Enzym-Mix

8 µl RNA (bis zu 2,5 µg, DNase I behandelt)

6 µl DEPC-Wasser

Die cDNA Synthese wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

25°C 10 Min.

42°C 60 Min.
 85°C 5 Min.
 4°C

2.9.3 Real-Time PCR

Material: gestopfte Spitzen, Multiwell Platte 384
 Lösungen: Genspezifische Primer, LightCycler® 480 DNA SYBR Green I Master
 Methode: Folgende Lösung wurde bei 4°C angesetzt:
 5 µl SYBR Green
 2 µl Primer-Mix (5 µM)
 2 µl cDNA (10 ng)
 1 µl DEPC Wasser

Das PCR-Programm enthielt folgende Parameter:

1 Zyklus	95°C	10 Min.
45 Zyklen	95°C	20 Sek.
	60°C	1 Min.
1 Zyklus	95°C	1 Sek.
	50°C	10 Sek.
	auf 95°C (0,11°C/Sek.)	
1 Zyklus	40°C	30 Sek.

Die relative Datenquantifizierung erfolgte anhand der $\Delta\Delta C_T$ Methode, wobei die Werte gegen GAPDH normalisiert wurden.

2.9.4 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung der PCR Produkte erfolgte mit einer Agarosegelelektrophorese. Die Produktgröße wurde anhand eines Größenmarkers bestimmt.

Material: Gelkammer, Gelkämme, Elektrophoreseapparatur
 Lösungen: Agarose, TE- Puffer, SYBR®Safe DNA Gel Stain (1:15.000)
 Methode: 3 g Agarose wurden mit 150 ml TE-Puffer versetzt und kurz in der Mikrowelle aufgekocht. Anschließend wurde 10 µl SYBR DNA Gel Stain zugesetzt, das flüssige Agarosegel

in die Kammer gegossen und die Probenkämme eingesetzt. Nach dem Erkalten wurde das Gel in die mit TE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die Proben wurden mit 5 µl 5x Probenpuffer gemischt und 15-20 µl in die Taschen gefüllt. Die PCR Produkte wurden anschließend 30-40 Min. bei 120 V und 400 mA aufgetrennt. Die aufgetrennten PCR Produkte wurden mithilfe einer UV-Lampe detektiert und nach ihrer Größe analysiert.

2.10 Angewandte Modelle der experimentellen Hepatitis

2.10.1 Concanavalin A (ConA) vermittelte Entzündung der Leber

Material: Kanüle, Spritze, Glaskanüle (heparinisiert), Reflexionsphotometer

Lösungen: PBS, NaCl₂, ConA (1,6 mg/ml in NaCl₂), Heparin

Methode: Mäusen wurde 16 mg ConA je Kilogramm Körpergewicht intravenös (i.v.) injiziert. Nach zwei Std. wurde den Tieren eine kleine Menge Blut aus der Schwanzvene entnommen und in ein mit 2 µl Heparin gefülltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das Blut zentrifugiert (13.000 U/min., 5 Min., 4°C). Die im Plasma enthaltenen Zytokine wurden mittels der *Real-Time* PCR quantifiziert. Weitere 6 Std. später wurden die Tiere durch CO₂-Begasung getötet, Blut aus der *Vena Cava*, sowie die Leber entnommen. Ein Teil des Blutes wurde zur Quantifizierung von Transaminasen verwendet, die mithilfe eines Reflexionsphotometers bestimmt wurden.

2.10.2 Das Galaktosamin/LPS-Hepatitis-Modell

Material: Kanüle, Spritze, Glaskanüle (heparinisiert), Reflexionsphotometer

Lösungen: PBS, NaCl₂, Galaktosamin (GalN; 100mg/ml in PBS), Lipopolysaccharid (LPS) in PBS

Methode: Die Induktion akuter Leberveränderungen in diesem Modell basiert auf der verstärkten Empfindlichkeit GalN-behandelter Tiere gegenüber Endotoxinen. Der apoptotische Zelluntergang der Hepatozyten wird letztendlich durch TNF vermittelt. Mäusen wurde je 20 mg Galaktosamin mit unterschiedlichen Mengen LPS beziehungsweise TNF intraperitoneal injiziert. Für die Quantifizierung inflammatorischer Zytokine wurden die Tiere nach einer Stunde getötet und Lebergewebe für die Isolation von RNA entnommen. Für den Nachweis der Leberschädigung wurde den Tieren nach 6 bis 8 Std. Blut aus der Schwanzvene entnommen und die Menge der Lebertransaminasen anhand eines Reflexionsphotometers bestimmt.

2.11 Makrophagen-Depletion

Für die Depletion von Makrophagen wurde in Liposomen eingekapseltes Dichloromethylen-Bisphosphonat (Cl₂MBP) verwendet. Da frei gelöstes Clodronat Zellmembranen nicht passieren kann, dienen Liposomen als Vehikel. Makrophagen nehmen die Liposomen über Endozytose auf und die zellspezifische lysosomale Phospholipase spaltet diese auf. Das gespeicherte Clodronat wird in der Zelle freigesetzt, akkumuliert und zerstört den Zellmetabolismus. Dadurch wird die Apoptose in diesen Zellen induziert (van Rooijen et al., 1997; Van Rooijen and Sanders, 1994).

Material: Kanüle, Spritze

Lösungen: Cl₂MBP-Liposomen

Methode: Um eine ausreichende Effizienz der Depletion zu erreichen, wurde Mäusen zweimal Cl₂MBP-Liposomen injiziert. Die Injektionen erfolgten 3 Tage und 1 Tag vor Induktion einer Hepatitis, wobei 50 µg Liposomen je Maus intravenös appliziert wurden.

2.12 Depletion neutrophiler Granulozyten

Material: Kanüle, Spritze

Lösungen: Ly6G-Antikörper (2,5 mg/ml), NaCl₂

Methode: Die Blockade neutrophiler Granulozyten erfolgte durch Verwendung eines depletierenden Ly6G-Antikörpers. Von diesem wurden je Maus 200 µl (500 µg) 2 Tage und erneut 2 Std. vor Beginn eines Experimentes intravenös injiziert.

2.13 Generierung T Zell spezifischer PPAR γ Knockout Mäuse

In eigener Zucht wurden PPAR γ ^{fl/fl} Mäuse mit CD4Cre⁺ Mäusen, welche die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des CD4 Promotors exprimieren, verpaart. Dieses resultiert in einem spezifischen PPAR γ Knockout in T Zellen. Der Vergleich der mRNA des Wildtyp PPAR γ (700 bp²⁹) mit der durch das Cre-Enzym verkürzten Form von PPAR γ (300 bp) ist in (Klotz et al., 2009a) dargestellt.

²⁹ engl. *base pairs*

2.14 Statistische Analysen

Alle Experimente wurden mindestens zwei Mal durchgeführt. Bei den *in vivo* Versuchen bestand eine Gruppe aus jeweils drei oder mehr Tieren. Die Fehlerabweichungen sind als Standardabweichung (SD³⁰) angegeben. Zur Berechnung der Signifikanz wurde der zweiseitige Student's t-Test oder der ANOVA Newman-Keuls Test verwendet (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

³⁰ engl. *standard deviation*

IV. Ergebnisse

1. Einfluss des Transkriptionsfaktors PPAR γ auf die Immunfunktion von LSEC

Der *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma* (PPAR γ) ist ein Mitglied der Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren. Diese sind Transkriptionsfaktoren, die nach Bindung spezifischer Liganden die Expression metabolischer und pro-inflammatorischer Zielgene regulieren. PPAR γ wird in vielen Zellen des Immunsystems, sowie in neuronalen und Glia Zellen exprimiert.

In dieser Arbeit sollte zunächst der Einfluss von PPAR γ auf die Immunfunktion der leberresidenten Antigen präsentierenden lebersinusoidalen Endothelzellen (LSEC) untersucht werden. LSEC säumen die Sinusoide der Leber und kommen dadurch laufend in Kontakt mit im Blut transportierten Antigenen und passierenden Leukozyten (MacPhee et al., 1995; Wisse et al., 1985). Außerdem exprimieren LSEC ein breites Spektrum an *pattern-recognition*-Rezeptoren (PRR), die es ihnen ermöglichen auf Gefahrensignale der Umgebung in Form von pathogen-assoziierten Molekülen (PAMP) zu reagieren (Kern et al., 2010). In professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC³¹), wie dendritischen Zellen (DC³²), führt die Aktivierung von PPAR γ zu einer verminderten *toll-like*-Rezeptor (TLR) vermittelten Expression von IL12 (Klotz et al., 2007).

1.1 TLR vermittelte Aktivierung

Um den Einfluss von Pio auf PPAR γ in LSEC zu untersuchen, musste zunächst die Expression von PPAR γ in den LSEC sichergestellt werden. Hierzu wurde die Expression von PPAR γ in LSEC über PCR nachgewiesen (Abb. IV.1A). Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der PCR. Die RNA von aus C57BL/6 Mäusen isolierten LSEC wurde zunächst

³¹ engl. *antigen presenting cell*

³² engl. *dendritic cell*

in cDNA umgeschrieben und anschließend mit spezifischen PPAR γ -Primern amplifiziert. Man erkennt im Agarosegel das PPAR γ -Signal bei 700 Basenpaaren (bp).

Nach dem Nachweis der PPAR γ Expression in LSEC konnten die Auswirkungen von Pioglitazon (Pio) auf die PPAR γ vermittelte Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL6 untersucht werden. Hierzu wurden C57BL/6-Mäuse mit dem synthetischen PPAR γ -Agonisten Pio gefüttert und anschließend die aufgereinigten LSEC mit unterschiedlichen TLR Liganden stimuliert und nach 24 Std. die Produktion von IL6 bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass LSEC von Mäusen, welche nur mit der Trägersubstanz Carboxymethylcellulose (Cmc) behandelt wurden, durch die Stimulation mit den TLR3 und TLR4 Liganden PolyIC bzw. LPS große Mengen IL6 ausschütteten. Im Gegensatz hierzu sezernierten LSEC von Mäusen in denen PPAR γ durch Pio aktiviert wurde, signifikant weniger IL6 (Abb. IV.1B). Die Stimulation mit Liganden für TLR2 (Pam3Cys), TLR7 (9.2sRNA) und TLR9 (CpG) führte hingegen nur zu einer schwachen IL6 Expression, die durch Pio nicht maßgeblich verändert wurde (Abb. IV.1B).

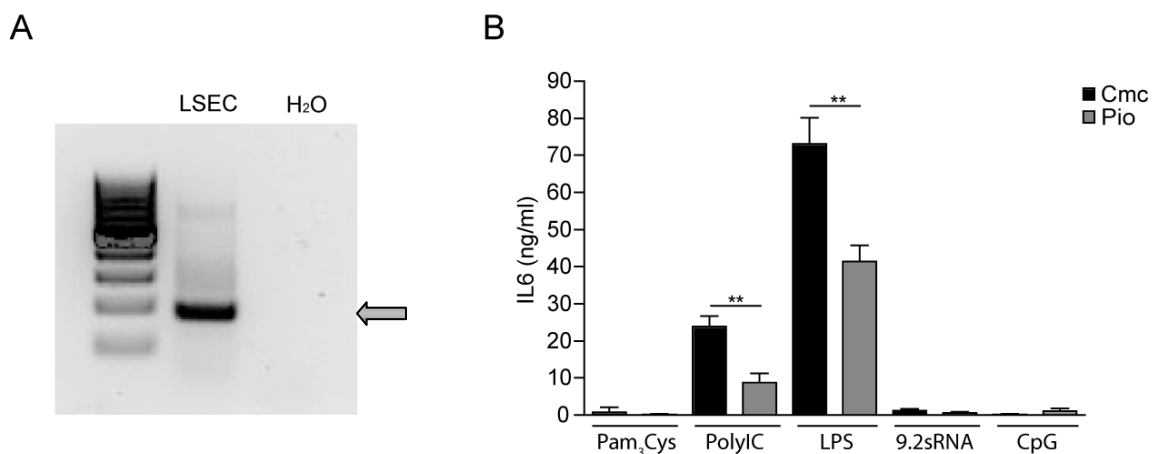


Abb. IV.1 PCR Analyse von PPAR γ in LSEC und Einfluß von Pio auf die TLR Liganden induzierte Stimulation der IL6 Expression in LSEC

A) PCR Analyse der cDNA unstimulierter LSEC nach PPAR γ Expression. B) C57BL/6 Mäusen wurde 7 Tage lang Pio bzw. Cmc p.o. verabreicht, anschließend wurden die LSEC isoliert und diese *in vitro* mit TLR Liganden stimuliert: TLR2 (Pam3Cys, 1 μ g/ml); TLR3 (polyIC, 10 μ g/ml); TLR4 (LPS, 100 ng/ml); TLR7 (9.2s RNA, 6 μ g/ml in Dotap) und TLR9 (CpG 1668, 2,5 nmol/ml in Dotap). Nach 24 Std. wurden die Konzentrationen von IL6 in den Überständen mittels ELISA bestimmt. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von einem repräsentativen Experiment aus drei unabhängigen Experimenten; (schwarze Balken: Cmc, graue Balken: Pio).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Pio die TLR3/4 induzierte Stimulation der PPAR γ vermittelten IL6 Expression reduzieren kann, sollte in weiteren Experimenten der Einfluss von Pio auf die mögliche PPAR γ vermittelte Expression von immunologisch relevanten Oberflächenmolekülen auf LSEC getestet werden. Hierbei wurde der Schwerpunkt auf die Oberflächenmolekülen CD54 (ICAM³³) und CD106 (VCAM³⁴), sowie das koinhibitorische Molekül B7H1 gelegt (Diehl et al., 2008; Knolle and Gerken, 2000). Bei DC wird die B7H1 Expression durch PPAR γ Aktivierung erhöht (Klotz et al., 2009b), die TLR4 induzierte Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle hingegen reduziert (Klotz et al., 2007).

Deshalb sollte zunächst untersucht werden, ob die Expression von Oberflächenmolekülen auf LSEC ebenfalls durch PPAR γ reguliert werden kann. Hierfür wurden LSEC mit den Liganden für TLR3 und TLR4 stimuliert, da diese, wie bereits in Abbildung IV.1B dargestellt, LSEC sehr effizient aktivieren. C57BL/6 Mäusen wurde 7 Tage lang Pio bzw. Cmc *per os* (p.o.) appliziert und anschließend die LSEC isoliert. Diese wurden *in vitro* mit den TLR3/4 Liganden PolyIC bzw. LPS inkubiert und nach 24 Std. die Expression der Moleküle CD54, CD106 und B7H1 am Durchflusszytometer analysiert. Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei DC zeigte sich, dass die Stimulation von TLR3 und TLR4 in LSEC die Expression von B7H1 induzierte, diese aber durch die Pio vermittelte Aktivierung von PPAR γ gehemmt wurde (Abb. IV.2). Die Expression der Adhäsionsmoleküle CD54 und CD106 wurde in Pio behandelten und unbehandelten LSEC gleichermaßen durch TLR Ligandenbindung gesteigert. Zusammenfassend zeigt sich, dass die Pio vermittelte Aktivierung von PPAR γ die TLR induzierte IL6 Sekretion von LSEC hemmt und die Expression des koinhibitorischen Moleküls B7H1 reduziert.

³³ engl. *inter-cellular adhesion molecule*

³⁴ engl. *vascular cell adhesion molecule*

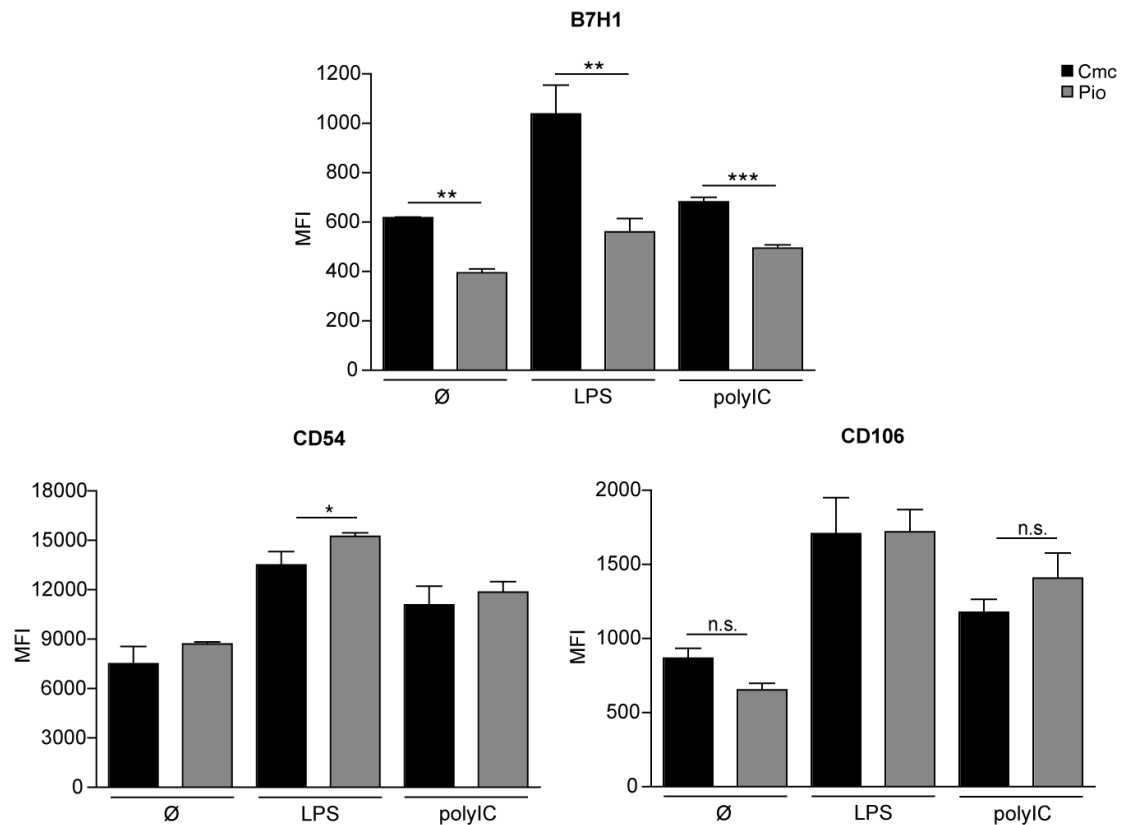


Abb. IV.2 Einfluss der Pio vermittelten Aktivierung von PPAR γ auf die TLR induzierte Expression von Oberflächenmolekülen bei LSEC

LSEC wurden aus mit Pio gefütterten oder kontrollbehandelten C57BL/6 Mäusen isoliert und mit Liganden für TLR3 (PolyIC, 10 μ g/ml) und TLR4 (LPS, 100 ng/ml) stimuliert. Die Analyse der Expression der Oberflächenmoleküle geschah nach 24 Std. mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität \pm SD eines repräsentativen Experiments aus drei unabhängigen Experimenten; (\emptyset : PBS, schwarze Balken: Cmc, graue Balken: Pio).

1.2 Kreuzpräsentation

Die Leber ist ein Organ, das eher die Entstehung peripherer Toleranz als Immunität vermittelt. LSEC spielen dabei eine entscheidende Rolle (Limmer et al., 2000). Die Leber ist über die Portalvene mit dem gastrointestinalen Trakt verbunden. Dies führt dazu, dass LSEC ständig mit oralen Antigenen, die im Darm resorbiert werden, in Kontakt kommen. Als leberresidente APCs nehmen sie sehr effizient exogene Antigene über Mannose- und *Scavenger*-Rezeptoren aus dem zirkulierenden Blutstrom auf und präsentieren diese auf MHC Klasse I Molekülen CD8 T Zellen. Dieses führt zur Induktion antigenspezifischer, oraler Toleranz (Limmer et al., 2000; Schurich et al., 2009).

Antigenaufnahme und die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation wird in DC durch die Aktivierung von PPAR γ gesteigert (Klotz et al., 2009b). Ob dieser Effekt auch in LSEC zu beobachten ist, sollte im Folgenden untersucht werden. Dazu wurden C57BL/6 Mäuse mit Pio gefüttert, anschließend die LSEC isoliert und *in vitro* mit dem Modellantigen Ovalbumin (OVA) bzw. mit dem OVA-Peptid SIINFEKL inkubiert. Um festzustellen, ob PPAR γ Einfluss auf die Kreuzpräsentation des aufgenommenen Antigens hat, wurden die Endothelzellen mit einer OVA-spezifischen T Zellhybridom-Zelllinie (B3Z) kokultiviert, die auf H2K^b präsentierte SIINFEKL erkennt und daraufhin IL2 sekretiert.

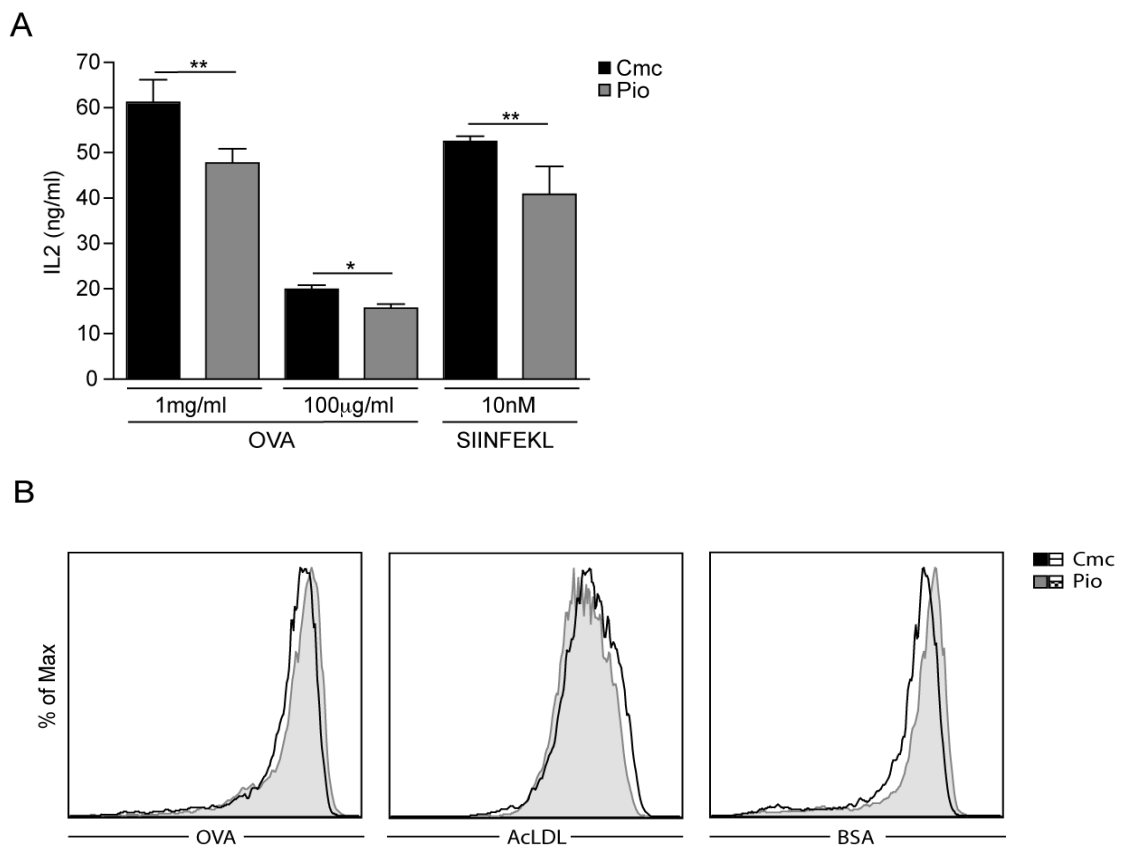


Abb. IV.3 Einfluss von Pio auf die Kreuzpräsentation und Antigenaufnahme von LSEC

A) LSEC aus Pio- bzw. Cmc-behandelten C57BL/6 Mäusen wurden *in vitro* mit der angegebenen Konzentration OVA oder SIINFEKL beladen und die Kreuzpräsentation von löslichem Antigen anhand der IL2 Sekretion der H2K^b-SIINFEKL-spezifischen T Zelllinie mittels ELISA bestimmt. Zu sehen ist der Mittelwert \pm SD eines von drei unabhängigen Experimenten; (schwarze Balken: Cmc, graue Balken: Pio). B) Intravenöse Injektion fluoreszenzmarkierter Antigene in mit Pio gefütterten und mit Cmc gefütterten C57BL/6 Mäuse: OVA-Alexa 647, acLDL-Alexa 488, BSA-Alexa 647 (je 4 μ g/Maus). Nach 2 Std. wurden LSEC aufgereinigt und im Durchflusszytometer analysiert; (schwarze Linie: Cmc, grau gefüllt: Pio). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Experimenten mit 3 Mäusen (n=3).

Mittels ELISA konnte festgestellt werden, dass LSEC, die vorher Pio ausgesetzt waren, eine geringere OVA und SIINFEKL induzierte B3Z Zellen vermittelte IL2 Produktion aufwiesen. Die Effizienz der Kreuzpräsentation wurde demzufolge durch die Pio vermittelte PPAR γ Aktivierung verringert (Abb. IV.3A). Dieser Effekt konnte für verschiedene Antigenkonzentrationen beobachtet werden. Ob die Reduktion auf eine verminderte Antigenaufnahme zurückzuführen war, wurde durch die Verwendung verschiedener fluoreszenzmarkierter Antigene überprüft. Hierzu wurde fluoreszenzgekoppeltes OVA, acetyliertes LDL (acLDL) oder Rinderserumalbumin (BSA³⁵) in mit Pio gefütterte und mit Cmc gefütterte C57BL/6 Mäuse intravenös injiziert und die LSEC hinsichtlich der Menge an aufgenommenen Antigen nach 2 Std. durchflusszytometrisch analysiert. Dabei zeigte sich, dass Pio die Aufnahme keines der untersuchten Antigene signifikant beeinflusste (Abb. IV.3B).

Schließlich bleibt fest zu halten, dass auch die Präsentation des SIINFEKL Peptids auf Pio behandelten LSEC zu einer verringerten IL2 Produktion der B3Z Zellen führte, was darauf hindeutet, dass allgemein die Antigenpräsentation in LSEC durch die Aktivierung von PPAR γ beeinflusst wurde.

1.3 Vermittlung von CD8 T Zell Toleranz

Die Tolerisierung von CD8 T Zellen gegenüber Antigenen des Gastrointestinaltraktes oder apoptotischer Zellen ist die Hauptfunktion der LSEC (Knolle et al., 1999; Limmer et al., 2000). Da im Vorfeld beobachtet werden konnte, dass Pio bzw. die Pio vermittelte Aktivierung von PPAR γ in LSEC die Kreuzpräsentation negativ regulierte, sollte geklärt werden, ob analog hierzu die Toleranzinduktion in T Zellen ebenfalls beeinflusst wird.

OT I T Zellen erkennen das durch die Prozessierung von OVA abstammende SIINFEKL-Peptid, wenn es auf MHC I Molekülen kreuzpräsentiert wird. Die Vermittlung von Toleranz ist ein aktiver Prozess, der zunächst zu einer initialen Aktivierung der T Zellen führt, was sich in der Sekretion proinflammatorischer Zytokine sowie in der Expression von Aktivierungsmarkern auf der Zelloberfläche widerspiegelt (Abb. IV.4).

³⁵ engl. *bovine serum albumin*

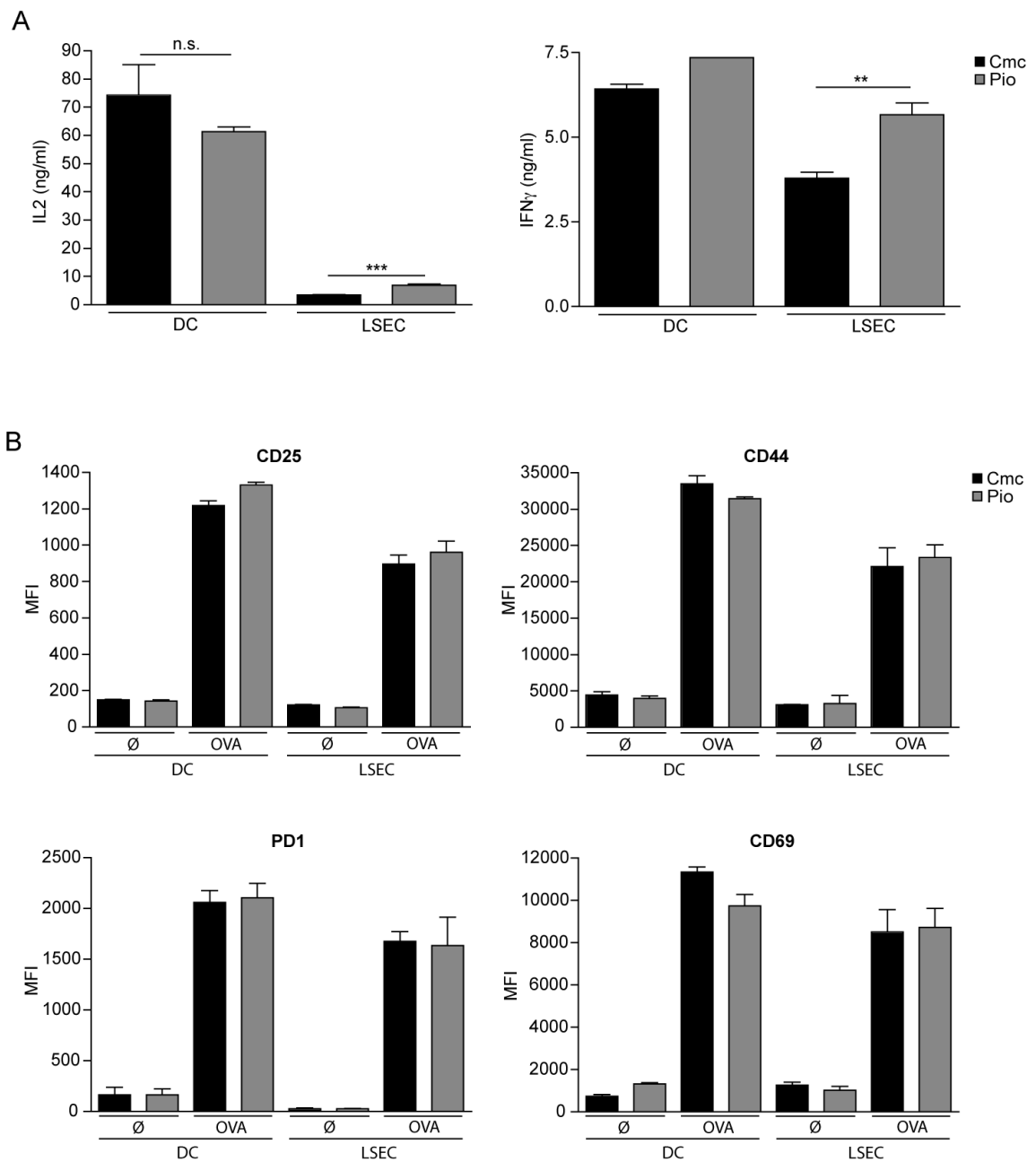


Abb. IV.4 Einfluss der PPAR γ Aktivierung in APC auf die initiale Aktivierung von CD8 $^+$ T Zellen

C57BL/6 Mäuse wurden mit Pio beziehungsweise mit Zellulose gefüttert, Milz DC und LSEC isoliert und diese mit OVA inkubiert (DC, 1 mg/ml; LSEC 100 μ g/ml). 24 Std. nach Kokultur mit naiven CD8 $^+$ OT I T Zellen wurde die Menge an IL2 und IFN γ in den Überständen mittels ELISA determiniert (A) und der Phänotyp verschiedener Aktivierungsmarker auf der Oberfläche der T Zellen am Durchflusszytometer analysiert (B). Mittelwerte und mittlere Fluoreszenzintensitäten eines repräsentativen Experiments von 3 unabhängigen Experimenten sind angegeben \pm SD; (schwarze Balken: Cmc, graue Balken: Pio).

Die Stimulation durch APC veranlasst T Zellen dazu unabhängig davon, ob diese durch DC oder LSEC aktiviert werden, zu proliferieren (Diehl et al., 2008). Aus diesem Grund wurde nach 72 Std. der Einfluss der PPAR γ Aktivierung in APC auf die Proliferation von CD8 T Zellen untersucht.

Näive CD8 OT I T Zellen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE markiert, bevor sie mit DC oder LSEC aus Pio oder Cmc gefütterten C57BL/6 Mäusen kokultiviert wurden. Nach 72 Std. wurde das Proliferationsprofil der T Zellen analysiert. Hierbei zeigte sich, dass mit DC kokultivierte T Zellen PPAR γ abhängig verzögert proliferierten, die Pio Behandlung von LSEC hingegen keine Auswirkungen auf die Proliferation von T Zellen hatte (Abb. IV.5).

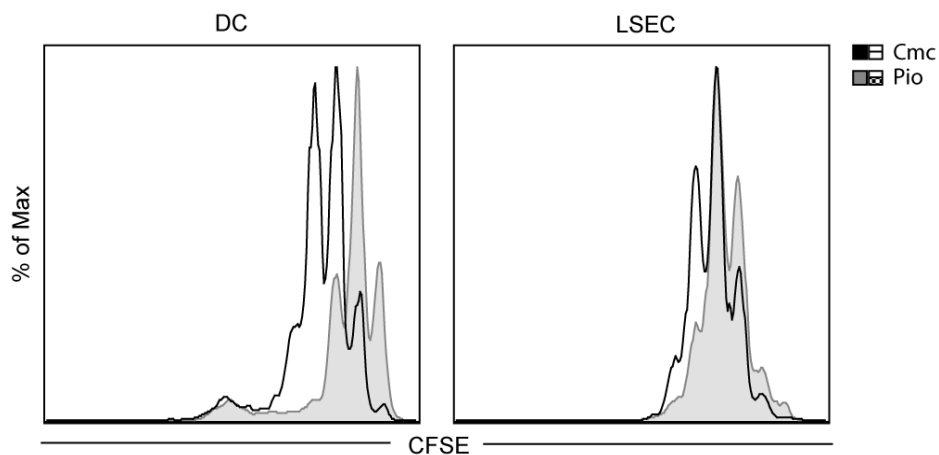


Abb. IV.5 Proliferationsprofil von CD8 T Zellen nach Kokultur mit PPAR γ aktivierten APC

CD8⁺ T Zellen wurden aus der Milz von OT I Mäusen isoliert, mit CFSE (1 μ M) markiert und mit APC (DC bzw. LSEC), die aus Pio gefütterten Mäusen oder Kontrollmäusen aufgereinigt wurden, kokultiviert. Die Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffes (CFSE) wurde nach 72 Std. mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Zu sehen ist ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Experimenten; (schwarze Linie: Cmc, grau gefüllt: Pio).

Der tolerogene Status von CD8 T Zellen definiert sich vor allem durch den Verlust der Funktionalität. Tolerisierte CD8 T Zellen zeigen keine zytotoxischen Effektorfunktionen und die Ausschüttung charakteristischer Zytokine nach Restimulation ist vermindert (Limmer et al., 2000).

Um zu überprüfen, ob Pio bzw. die dadurch vermittelte Aktivierung von PPAR γ den tolerogenen Status von CD8 T Zellen beeinflusst, wurden mit Pio behandelte bzw. unbehandelte APC mit CD8 OT I T Zellen über 4 Tage kokultiviert und die T Zellen im Anschluss hinsichtlich ihrer Reaktivität auf eine CD3 und CD28 Stimulation untersucht. Anhand der IFN γ Ausschüttung konnte hierbei über ELISA auf den tolerogene Status der Zellen geschlossen werden. War PPAR γ in DC aktiviert, reduzierte sich die IFN γ Sekretion der T Zellen nach Restimulation von 500 ng/ml auf 180 ng/ml. Die mit LSEC kokultivierten T Zellen hingegen blieben Pio unabhängig tolerant, d.h. nicht restimulierbar, was sich anhand fehlender Zytokinausschüttung zeigte (Abb. IV.6). Daraus lässt sich schließen, dass die Pio induzierte Aktivierung von PPAR γ in LSEC keinen Einfluss auf die Tolerisierung von CD8 T Zellen hat.

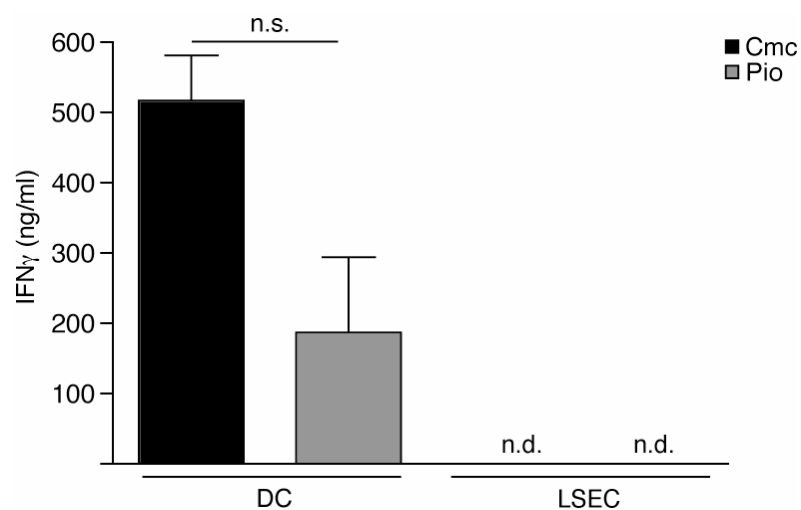


Abb. IV.6 Die tolerogenen Eigenschaften von LSEC werden durch PPAR γ nicht beeinflusst

CD8 OT I T Zellen wurden über Lymphozyten-Präparation nach 4 Tagen Kokultur mit Pio behandelten oder unbehandelten DC beziehungsweise LSEC isoliert und mit anti-CD3 und anti-CD28 beschichteten Kügelchen restimuliert. Nach 24 Std. wurde die Menge an IFN γ in den Überständen durch ELISA bestimmt. Aus einem repräsentativen Experiment von drei unabhängigen Experimenten sind die Mittelwerte \pm SD dargestellt; (n.d.: nicht detektierbar, schwarze Balken: Cmc, graue Balken: Pio).

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass eine pharmakologische Aktivierung von PPAR γ in LSEC deren Reaktivität gegenüber exogener Gefahrensignale herabgesetzt hat. Zudem wurde die Fähigkeit der Antigenpräsentation durch die

Verabreichung von Pio herabgesetzt, obwohl die Antigenaufnahme nicht beeinflusst wurde. Die durch LSEC vermittelte CD8 T Zell Toleranz blieb trotz der Aktivierung von PPAR γ in den LSEC erhalten.

2. Die Funktion von PPAR γ in Modellen einer experimentellen Hepatitis

In mehreren Studien wurde bereits gezeigt, dass die Behandlung mit synthetischen PPAR γ Liganden beispielsweise chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (IBD³⁶) oder Entzündungen des zentralen Nervensystems, wie die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), das wichtigste Tiermodell der Multiplen Sklerose, verzögern und sogar mildern kann (Caprioli et al., 2008; Fletcher et al., 2010).

Basierend auf diesen Erkenntnissen sollte untersucht werden, ob sich die pharmakologische Aktivierung von PPAR γ durch Pio protektiv auf die Entwicklung einer immunvermittelten Hepatitis auswirkt. In einem ersten Schritt wurde hierzu zunächst der Effekt der PPAR γ Aktivierung auf einen Concanavalin A (ConA) vermittelten Leberschaden analysiert.

2.1 Concanavalin A induzierte Hepatitis

Die ConA induzierte Leberentzündung dient als Modell einer Autoimmun-Hepatitis, wenngleich ConA weder ein Autoantigen ist, noch die Ausschüttung von Autoantikörpern bewirkt. Die einmalige intravenöse Injektion von ConA induziert einen akuten inflammatorischen Leberschaden, der maßgeblich auf der Aktivierung von T Zellen und Kupffer Zellen basiert (Tiags et al., 1992; Tyan, 1974) (Abb. IV.7). Die Schädigung des Lebergewebes geht einher mit der Ausschüttung hepatischer Transaminasen bereits acht Std. nach der Injektion (Tiags et al., 1992).

³⁶ engl. *Inflammatory bowel disease*

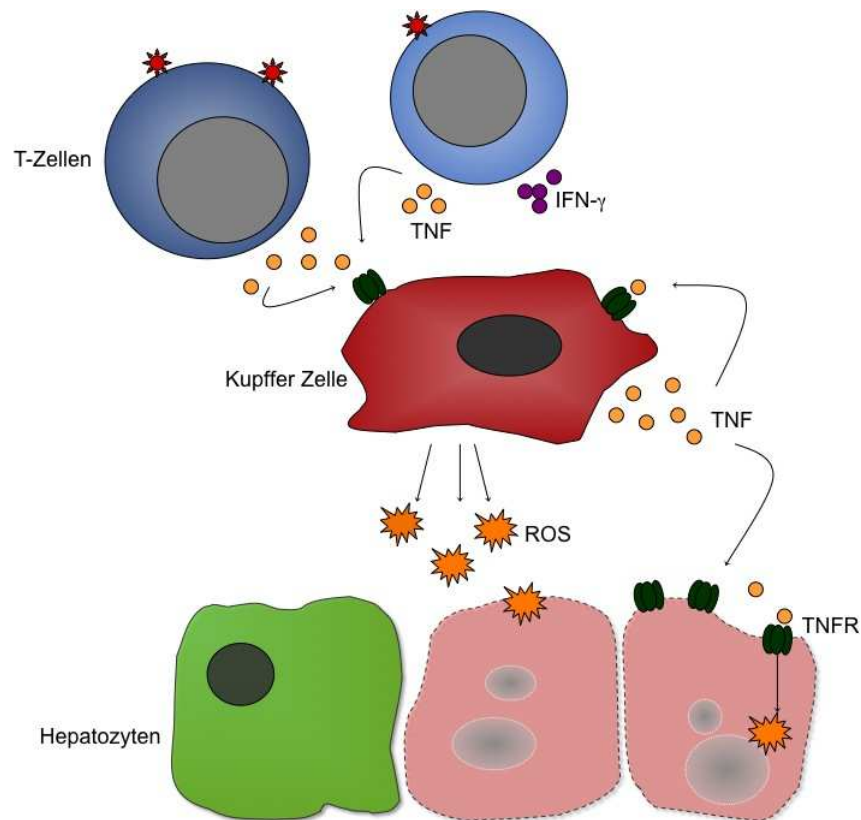


Abb. IV.7 Schematische Darstellung der Etablierung einer ConA vermittelten Hepatitis

T-Lymphozyten werden unspezifisch von ConA aktiviert, was die Ausschüttung der inflammatorischen Zytokine IFN γ und TNF zur Folge hat. TNF aktiviert Kupfer Zellen, die daraufhin nicht nur große Mengen dieses Zytokins, sondern auch reaktive Sauerstoffradikale (ROS³⁷) sezernieren. Extrazelluläres ROS der Kupfer Zellen und durch TNF induziertes intrazelluläres ROS führen zur Apoptose in Hepatozyten.

Da für Makrophagen eine Inhibition der TNF Produktion durch PPAR γ Aktivierung beschrieben ist (Jiang et al., 1998), wurde untersucht, ob die durch ConA induzierte Leberschädigung durch PPAR γ Aktivierung *in vivo* gemildert werden kann.

Hierzu wurden C57BL/6 Mäuse mit Pio oder dem Trägerstoff allein gefüttert, anschließend ConA intravenös appliziert und der Schweregrad der Leberentzündung anhand der Menge der ins Serum freigesetzten Transaminasen bestimmt. In Abbildung IV.8A sind die Serumwerte der Alanin-Aminotransferase (ALT) 8 bzw. 24 Std. nach ConA Administration dargestellt. Die Mittelwerte lagen bei 5000 bzw. 2500 U/l für die Pio behandelte und bei 5000 bzw. 3500 U/l für die Pio unbehandelte Versuchsgruppe.

³⁷ engl. *reaktive oxygen species*

Die annähernd gleichen Serumwerte der ALT deuten an, dass die Behandlung mit Pio keinen signifikanten Einfluss auf die Leberschädigung hatte (Abb. IV.8A). Parallel wurden zusätzlich die mRNA Spiegel intrahepatischer Zytokine gemessen. Hier zeigte sich, dass die Transkription von TNF in Lebern der PPAR γ aktivierten Mäuse höher war als in den Vergleichstieren. Auch die mRNA Mengen der Zytokine IFN γ und IL6 waren in mit Pio gefütterten Mäusen tendenziell höher, wenn auch nicht signifikant. Die Transkription des antiinflammatorischen Zytokins IL10 blieb durch PPAR γ Aktivierung unverändert (Abb. IV.8B).

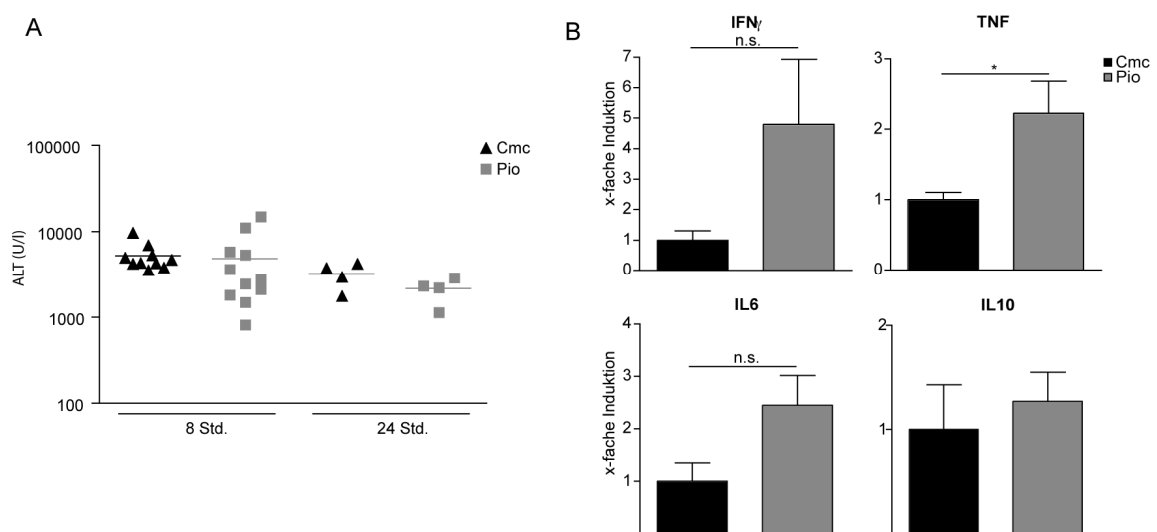


Abb. IV.8 Einfluss der Aktivierung von PPAR γ auf die Entwicklung der ConA induzierten Hepatitis

A) C57BL/6 Mäusen wurden 7 Tage lang mit Pio bzw. Cmc gefüttert. Am folgenden Tag wurde 30 mg/kg Körpergewicht ConA i.v. gespritzt und nach 8 bzw. 24 Std. Schwanzblut zur Bestimmung der Serum-ALT-Werte entnommen; (jedes schwarze Dreieck repräsentiert ein mit Cmc gefüttertes Tier, jedes graue Quadrat steht für eine mit Pio gefütterte Maus). B) RNA wurde aus Lebergewebe isoliert, revers transkribiert und eine quantitative *Real-Time-PCR* durchgeführt. Errechnet wurde das Verhältnis der Pio Werte zu den Werten aus Cmc behandelten Tiere (=1 gesetzt). Die Daten veranschaulichen das Ergebnis eines aus zwei unabhängigen Experimenten mit 4 Mäusen (n=4); (n.s.: nicht signifikant, schwarze Balken: Cmc, graue Balken: Pio).

Durch die systemische Verabreichung von Pio können extrinsische, PPAR γ unabhängige Effekte stattfinden. Aus diesem Grund wurden die Auswirkungen einer PPAR γ Defizienz *in vivo* untersucht. Da der durch ConA induzierte Leberschaden maßgeblich auf einer

initialen Aktivierung von T Zellen beruht, wurden Mäuse eingesetzt, die einen T Zell spezifischen PPAR γ *Knockout* aufweisen.

Grundlage dieses spezifischen PPAR γ *Knockouts* in T Zellen ist das Cre/loxP System (Abb. IV.9). Dieses ermöglicht die gewebs- oder zellspezifische Genmodifikation. Die zu entfernende DNA-Sequenz eines Gens wird dazu von zwei loxP-Sequenzen flankiert. Die Cre-Rekombinase erkennt und bindet die loxP-Stellen, wobei die entsprechende DNA-Sequenz heraus geschnitten wird. In den verwendeten *Knockout* Mäusen wird die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des CD4 Promotors exprimiert. Dieses resultiert in einem spezifischen PPAR γ Knockout in T Zellen, da sowohl einfach positive CD4 als auch einfach positive CD8 T Zellen während der Reifung im Thymus ein CD4⁺CD8⁺ doppelt positives Stadium durchlaufen.

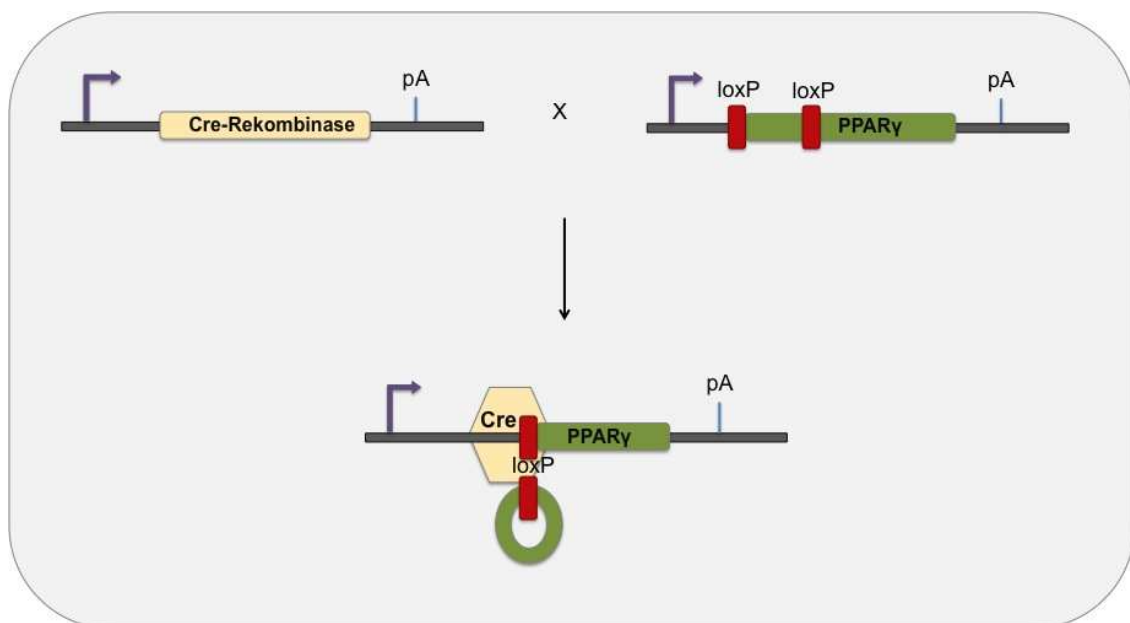


Abb. IV.9 Schematische Darstellung des Cre/loxP Systems

Folglich wurde ConA in PPAR γ defiziente CD4Cre⁺PPAR γ ^{fl/fl} und entsprechende CD4Cre⁻PPAR γ ^{fl/fl} Kontrollmäuse, die im Folgenden als Wildtyp bezeichnet werden, injiziert. Die Bestimmung der ALT-Level erfolgte in diesem Versuch bereits 5 Std. nach ConA Injektion, da zu diesem Zeitpunkt die ersten Tiere in beiden Gruppen bereits verstarben und sehr starke Leberschäden aufwiesen. Der Anstieg der ALT-Werte zeigte zwischen PPAR γ *Knockout* und Wildtyp Mäusen wie bereits zuvor keinen signifikanten

proinflammatorischer Zytokine beeinflusst werden (Clark et al., 2000; Cunard et al., 2004; Marx et al., 1998). In Monozyten und Makrophagen wirkt die Aktivierung von PPAR γ ebenfalls antiinflammatorisch (Jiang et al., 1998; Ricote et al., 1998).

Da während einer ConA Hepatitis erhöhte intrahepatische TNF mRNA Mengen nachgewiesen werden konnten (Abb. IV.8B) und T Zellen in diesem Hepatitis-Modell eine zentrale Rolle einnehmen, wurde im Folgenden der Einfluss von PPAR γ auf die Stimulation von T Zellen *in vitro* analysiert.

2.2.1 T Zell Rezeptor vermittelte Aktivierung

Obwohl die Aktivierung von PPAR γ in LSEC keine Auswirkungen auf die Toleranzinduktion in T Zellen hatte, könnte eine PPAR γ abhängige Inhibition der Aktivierung von T Zellen eine entscheidende Rolle im Verlauf hepatischer Entzündungsreaktionen spielen. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden naive CD8 T Zellen aus Pio behandelten oder Cmc behandelten C57BL/6 Mäusen *in vitro* aktiviert und die Reaktivität anhand der IFN γ Sekretion bestimmt. Für die Aktivierung naiver T Zellen reicht die Antigen Bindung des T Zell Rezeptors alleine nicht aus, ein zusätzliches Signal über einen kostimulatorischen Rezeptor, wie CD28, ist nötig (Allison, 1994; Janeway and Bottomly, 1994). Ein drittes, lösliches Signal, das zur Ausbildung der Effektorfunktionen essentiell ist, bildet das Interleukin 12 (IL12) (Curtsinger et al., 1999) oder auch Typ I Interferone (Curtsinger et al., 2005).

Folglich wurden die isolierten T Zellen mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper beschichteten Kügelchen kultiviert und IL12 zugegeben. Nach 24, 48 und 72 Std. wurden Überstände zur Bestimmung der Zytokinmenge entnommen. Dabei wurde deutlich, dass T Zellen Pio behandelter Mäuse eine deutlich niedrigere IFN γ Expression nach Aktivierung zeigten als T Zellen der Cmc behandelten Kontrollmäuse. Wobei dieser Effekt nach 48 Std. am deutlichsten zu erkennen war (Abb. IV.11). Diese Daten zeigten, dass die Aktivierung von PPAR γ in T Zellen diese unempfindlicher gegenüber einer Stimulation des T Zell Rezeptors macht.

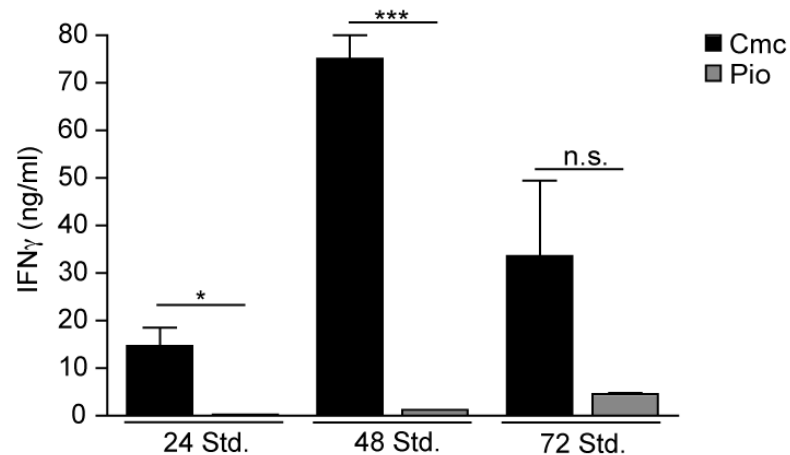


Abb. IV.11 PPAR γ inhibiert die Aktivierung von CD8⁺ T Zellen *in vitro*

C57BL/6 Mäuse wurden 7 Tage lang mit Pioglitazon bzw. Cellulose p.o. gefüttert, anschließend CD8⁺ T Zellen isoliert und diese *in vitro* mit anti-CD3/anti-CD28 beschichteten Kügelchen unter Zugabe von IL12 (10 ng/ml) stimuliert. Zu den gekennzeichneten Zeitpunkten wurden Überstände abgenommen und mittels ELISA die Konzentration an IFN γ bestimmt. Gezeigt sind repräsentative Daten eines aus drei unabhängigen Experimenten, dargestellt in Mittelwerten \pm SD; (n.s.: nicht signifikant, schwarze Balken: Cmc, graue Balken: Pio).

2.2.2 Concanavalin A induzierte T Zell Stimulation

Das Pflanzenlektin ConA aktiviert T Zellen unabhängig von ihrer Antigenspezifität und führt zur Expression der proinflammatorischen Zytokine IFN γ und TNF (Erhardt et al., 2007; Tiegs et al., 1992). Um die antiinflammatorische Wirkung von PPAR γ auf die ConA induzierte T Zell Aktivierung zu untersuchen, wurden B Zell depletierte Splenozyten aus Pio oder Cmc gefütterten C57BL/6 Mäusen verwendet. Die Depletion der B Zellen diente dabei der Anreicherung von T Zellen in der Zellsuspension. Abbildung IV. 12A zeigt, dass die Aktivierung von PPAR γ in Milzzellen die ConA induzierte Ausschüttung von IFN γ inhibierte und dieser Effekt über drei Tage aufrecht erhalten wurde.

Diese antiinflammatorische Wirkung von PPAR γ wurde durch die Verwendung T Zell spezifischer *Knockout* Mäuse bekräftigt. Wurden B Zell depletierte Splenozyten aus CD4-Cre⁺ PPAR $\gamma^{fl/fl}$ (PPAR $\gamma^{-/-}$) und entsprechenden Kontrollmäusen mit ConA stimuliert, wurde die Expression von IFN γ und TNF durch die Deletion von PPAR γ verstärkt (Abb. IV.12B, C).

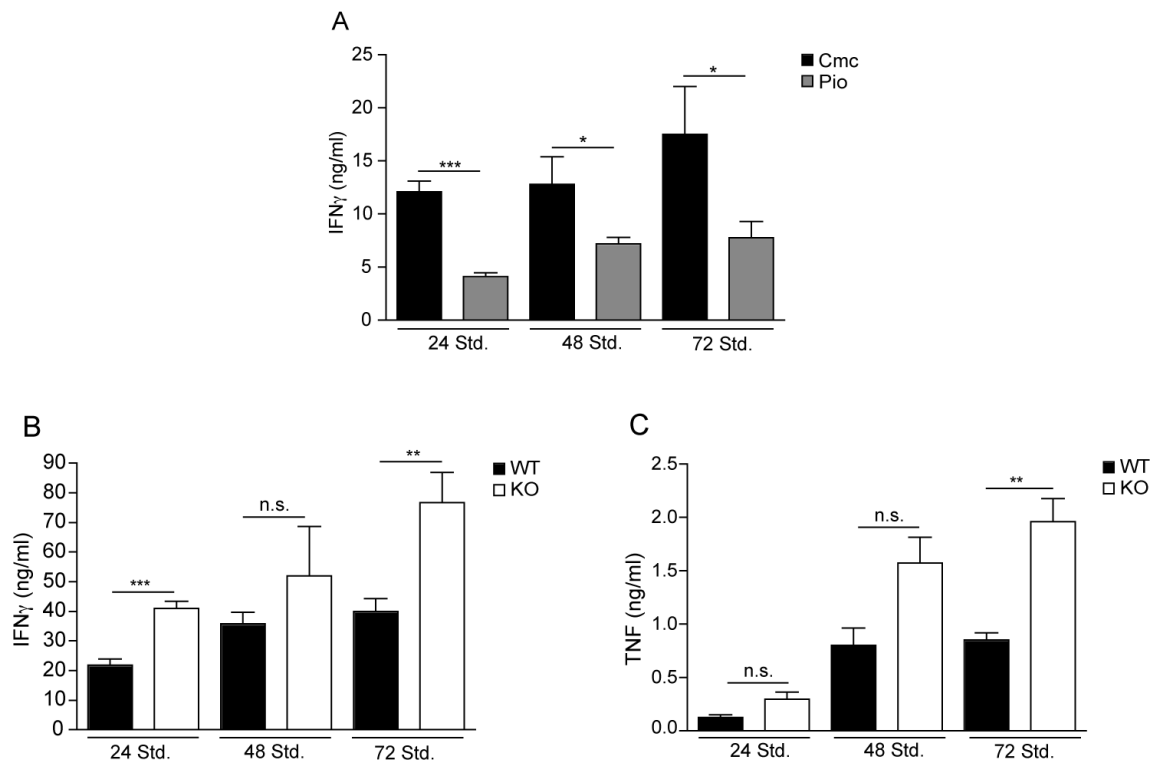
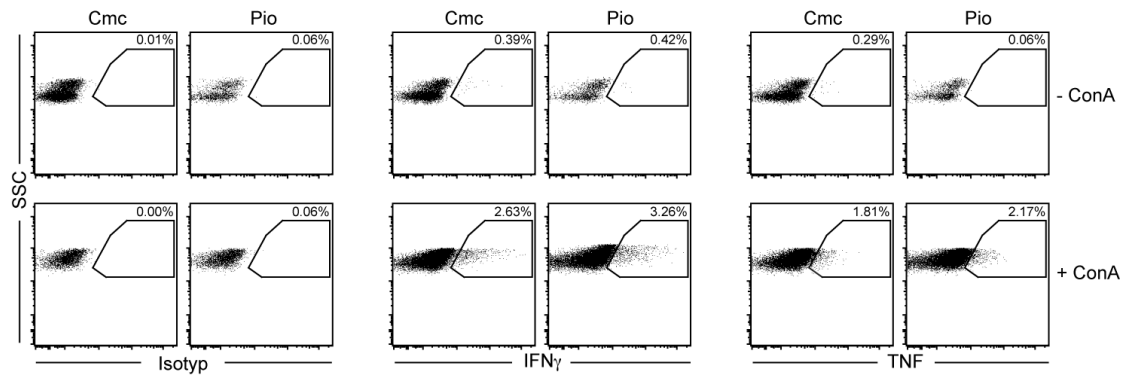


Abb. IV.12 Con A induzierte Zytokinexpression in Splenozyten

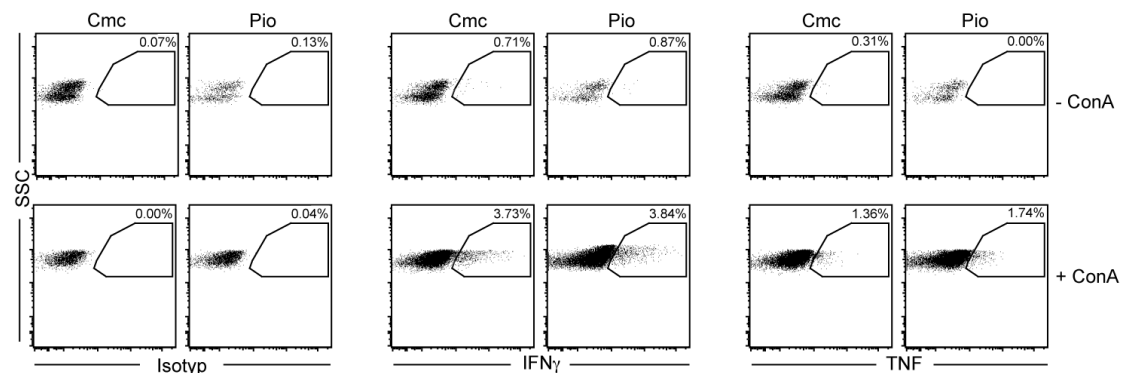
A) Milzzellen wurden aus gefütterten C57BL/6 Mäusen isoliert, über MACS-Separation von B-Zellen getrennt und mit ConA (5 μ g/ml) stimuliert. An den Tagen 1 bis 3 wurden Überstände abgenommen und IFN γ über ELISA detektiert. B, C) B-Zell depletierte Milzzellen aus CD4-Cre⁺ PPAR γ ^{fl/fl} bzw. aus CD4-Cre⁻ PPAR γ ^{fl/fl} wurden mit ConA (5 μ g/ml) stimuliert. Der Nachweis von IFN γ und TNF in den Zellkulturüberständen erfolgte mittels ELISA. Es sind jeweils die Mittelwerte \pm SD von einem repräsentativen Experiment aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt; (n.s.: nicht signifikant, schwarze Balken: A) Cmc, (B,C) CD4-Cre⁻ PPAR γ ^{fl/fl} (wt), graue Balken: Pio, weiße Balken: CD4-Cre⁺ PPAR γ ^{fl/fl}).

Da ein deutlicher Effekt von PPAR γ auf die Aktivierung von Milzzellen zu beobachten war, wurde im Folgenden die Zytokinexpression auf Einzelzellebene durchflusszytometrisch analysiert. Dazu wurden B-Zell depletierte Milzzellen aus Pio- oder Cmc gefütterten Mäusen zunächst mit ConA stimuliert und nach 24 Std. die IFN γ sowie TNF Expression der CD4 und CD8 T Zellen bestimmt. Der Anteil IFN γ bzw. TNF exprimierender CD4 T Zellen wurde durch die PPAR γ Aktivierung reduziert, unabhängig von einer Pio-Behandlung exprimierten nur wenige CD8 T Zellen diese beiden proinflammatorischen Zytokine (Abb.IV.13).

A CD4 T Zellen



B CD8 T Zellen

**Abb. IV.13 Durchflusszytometrische Analyse PPAR γ aktivierter T Zellen**

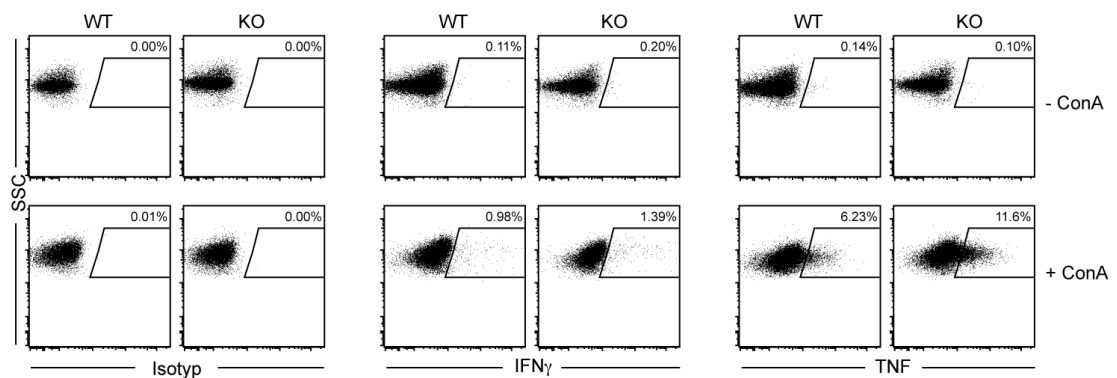
B Zell depletierte Splenozyten aus Pio bzw. Cmc behandelten C57BL/6 Mäusen wurden für 24 Std. mit 5 μ g/ml ConA oder ohne Zusatz inkubiert. Anschließend wurden IFN γ und TNF intrazellulär nachgewiesen und die entsprechende Isotyp Kontrolle durchgeführt. A) *Gegatet* wurde auf CD4 T Zellen. B) *Gegatet* wurde auf CD8 T Zellen. Im *Dot Blot* ist der prozentuale Anteil zytokinexprimierender Zellen gezeigt und in Werten angegeben. Repräsentative Ergebnisse von einem von drei unabhängigen Experimenten.

Abbildungen IV. 12B und C zeigen, dass durch die Deletion von PPAR γ in T Zellen die ConA induzierte Expression proinflammatorischer Zytokine erhöht wurde. Da es sich um einen generellen T Zell *Knockout* handelt, wurde nun untersucht, ob eher CD4 oder CD8 T Zellen erhöhte Reaktivität aufweisen. Dazu wurden Milzzellen aus T Zell spezifischen PPAR γ *Knockout* und Wildtyp Mäusen von B Zellen getrennt und mit ConA stimuliert.

Die Expressionslevel der Zytokine IFN γ und TNF wurden intrazellulär mittels Durchflusszytometrie analysiert. Hierbei konnte festgestellt werden, dass sowohl in

CD4 T Zellen, als auch in CD8 T Zellen ein PPAR γ abhängiger Anstieg der ConA vermittelten Zytokinexpression zu beobachten war. (Abb. IV.14). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Pio vermittelte antiinflammatorische Effekt der T Zellen vermutlich auf die Aktivierung von PPAR γ zurückzuführen ist, da das Fehlen dieses Transkriptionsfaktors zu einer Erhöhung der Aktivität von CD4 und CD8 T Zellen in Form einer erhöhten Anzahl IFN γ und TNF exprimierender Zellen führte.

A CD4 T Zellen



B CD8 T Zellen

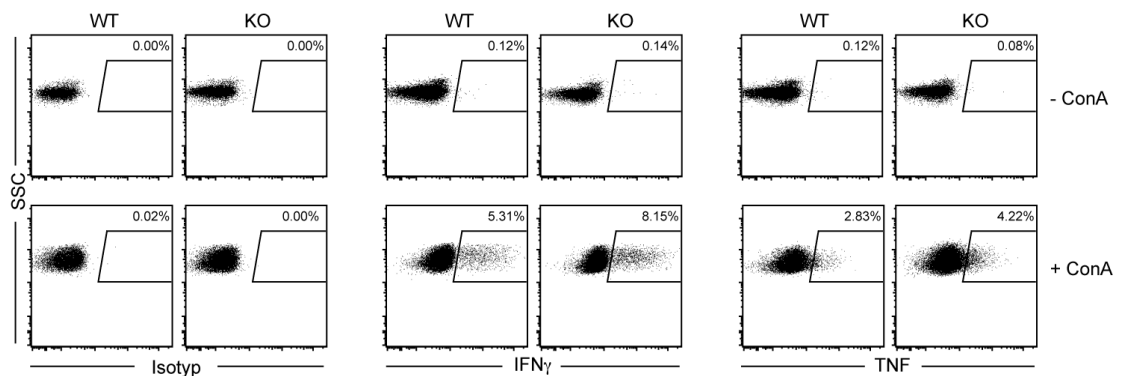


Abb. IV.14 Intrazelluläre Zytokinfärbung in T Zellen von PPAR γ Knockout und Wildtyp Mäusen

Milzzellen wurden aus CD4Cre⁺PPAR $\gamma^{fl/fl}$ und den Cre-negativen Wurfgeschwistern aufgereinigt, B Zellen über MACS-Separation isoliert und die verbleibenden Zellen mit ConA (5 μ g/ml) stimuliert oder unbehandelt gelassen. Intrazelluläre proinflammatorische Zytokine wurden durchflusszytometrisch in CD4 (A) und CD8 (B) T Zellen separiert. Der prozentuale Anteil IFN γ bzw. TNF positiver Zellen ist von einem repräsentativen Experiment aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

2.3 Das Galaktosamin/LPS-Hepatitis-Modell

Die Behandlung mit Pio reichte nicht aus, um den Krankheitsverlauf der ConA Hepatitis zu beeinflussen. Ob dieses generell für die Induktion von Leberentzündungen gilt, oder spezifisch für das ConA Modell ist, wurde im Folgenden untersucht. Dazu wurde der Effekt von Pio auf die durch Galaktosamin (GalN) und LPS induzierte Leberschädigung analysiert. GalN blockiert die Transkription durch den Mangel an Uracil Nukleotiden und verstärkt dadurch die Empfindlichkeit behandelter Tiere gegenüber Endotoxinen (Decker and Keppler, 1972). Dabei ist GalN spezifisch hepatotoxisch und wirkt sich nicht auf andere Organe oder Gewebe aus (Decker and Keppler, 1974). Das führt zur Apoptose der Hepatozyten, wobei TNF als einer der Hauptmediatoren dieser letalen Wirkung gilt (Galanos et al., 1979; Leist et al., 1995; Tiegs et al., 1989) (Abb. IV.15).

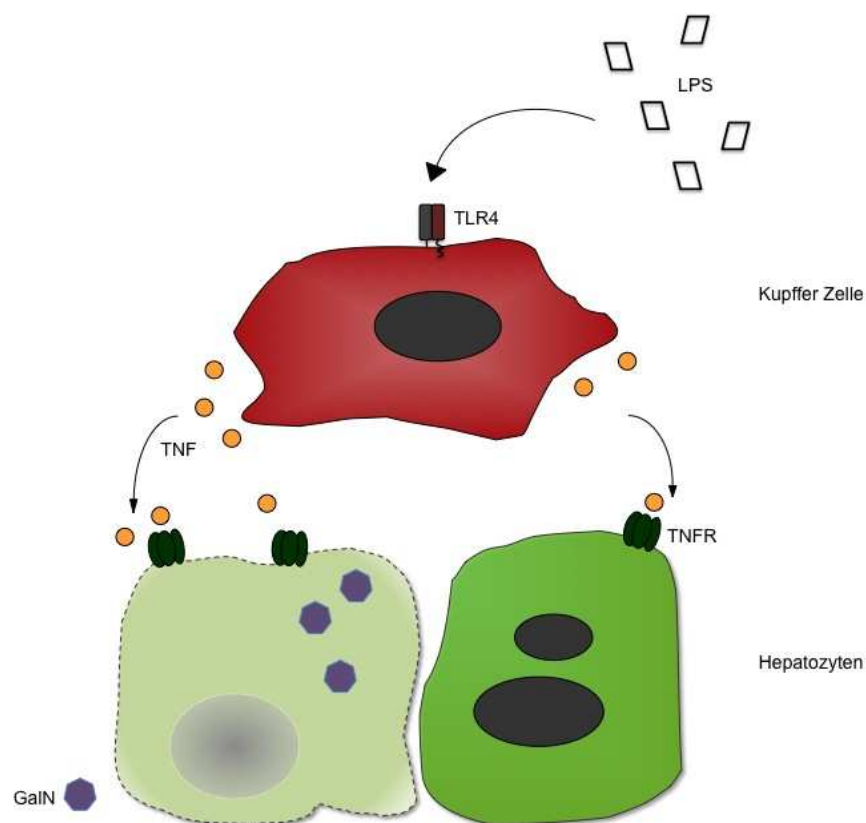


Abb. IV.15 Vereinfachte Darstellung der Induktion einer GalN/LPS-Hepatitis

LPS aktiviert Kupfer Zellen über die Bindung an TLR4. Daraufhin sezernieren Kupfer Zellen inflammatorische Zytokine wie TNF. Die Bindung von TNF an TNF Rezeptoren (TNFR) auf der Oberfläche von Hepatozyten aktiviert Signaltransduktionswege, die in GalN sensitivierten Hepatozyten Apoptose induzieren.

Zu hohe Dosen an LPS wirken in Kombination mit GalN lethal. Daher musste in einem Vorversuch zunächst die Dosis des verwendeten LPS titriert werden, um eine subletale Dosis des Endotoxins in Kombination mit GalN zu bestimmen. C57BL/6 Mäusen wurden 20 mg GalN und unterschiedliche Konzentrationen von LPS intraperitoneal (i.p.) injiziert und der Anstieg der Serumtransaminase nach 5 Std. gemessen. Abbildung IV. 16 zeigt, dass die Gabe einer hohen Dosis von LPS alleine keinen Leberschaden verursachte, ebenso wie die Injektion von 1 ng LPS in GalN-sensitivierten Tieren keine Erhöhung der ALT-Werte hervorrief. Wurden aber 100 ng bzw 1000 ng LPS mit GalN zusammen verabreicht, stiegen die ALT-Werte nach 5 Std. auf bis zu 1800 U/l an und die Tiere verstarben kurze Zeit später. Deshalb wurden für die folgenden Versuche 10 ng LPS mit GalN appliziert, was eine moderate, subletale Leberschädigung hervorrief wie anhand des Anstiegs der Transaminase Konzentration im Serum dokumentiert werden konnte (Abb. IV.16).

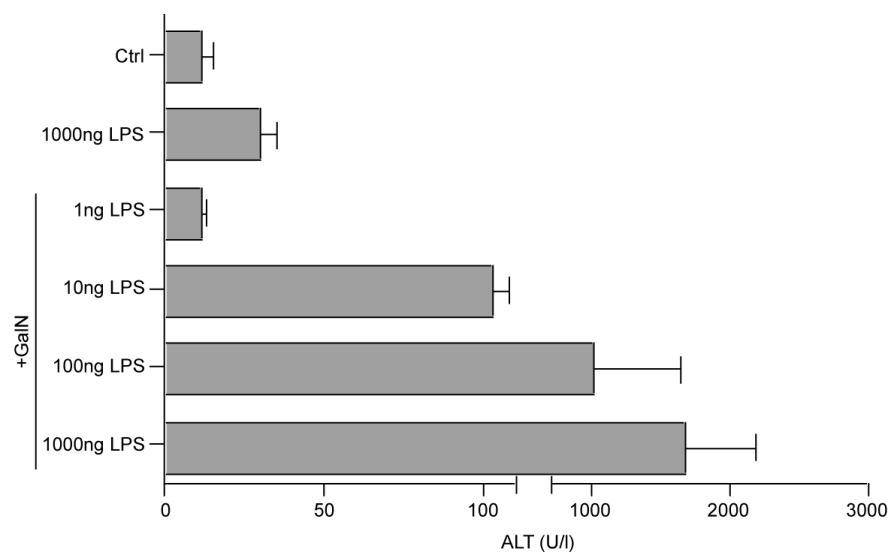


Abb. IV.16 LPS-Titration in GalN sensitivierten C57BL/6 Mäusen

Intraperitoneale Injektion unterschiedlicher Konzentrationen von LPS in Verbindung mit 20 mg GalN. Nach 5 Std. wurde den Mäusen Blut aus der Schwanzvene entnommen und die darin enthaltene ALT-Konzentration gemessen. Die Mittelwerte \pm SD mit $n=3$ Mäusen sind abgebildet.

In der Leber wird LPS vorwiegend durch Kupffer Zellen aufgenommen, in der Milz von Makrophagen und Granulozyten (Freudenberg and Galanos, 1990; Mathison and Ulevitch, 1979). Es wurde bereits gezeigt, dass eine Aktivierung von PPAR γ in Makrophagen die Transkription proinflammatorischer Zytokine, unter anderem von TNF, verhindert (Alleva et al., 2002).

Basierend auf diesen Daten sollte untersucht werden, ob die Entwicklung einer GalN/LPS vermittelten Hepatitis durch die Therapie mit Pio hinausgezögert oder gehemmt werden kann. Um dieses zu überprüfen wurden C57BL/6 Mäuse mit Pio oder Cmc über 7 Tage gefüttert und anschließend wurde ihnen GalN/LPS i.p. injiziert. Entgegen der Erwartungen führte die Pio Administration zu einer erheblichen Erhöhung des GalN/LPS induzierten Leberschadens, was sich in 6-fach erhöhten ALT-Werten im Serum der Pio gefütterten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren widerspiegelte (Abb. IV.17).

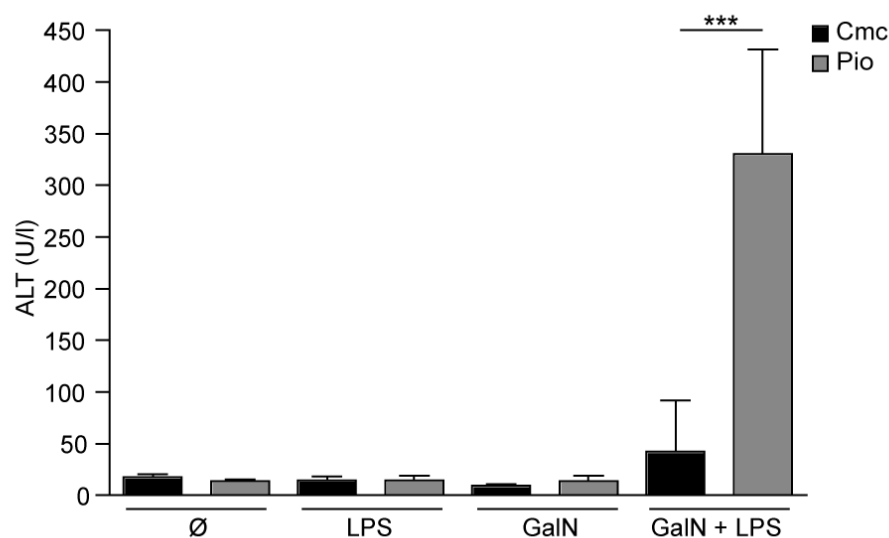


Abb. IV.17 Pioglitazon verstärkt den GalN/LPS induzierten Leberschaden

Pio bzw. Cmc gefütterten C57BL/6 Mäusen wurde PBS, 10 ng LPS, 20 mg GalN oder LPS (10 ng) zusammen mit GalN (20 mg) i.p. injiziert und nach 6 Std. die ALT-Werte im Blut bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD von einem repräsentativen Experiment aus drei unabhängigen Experimenten mit 4 Mäusen (n=4); (Ø: PBS, schwarze Balken: Cmc, graue Balken: Pio).

Frühere Arbeiten zeigten, dass die Leberschädigung im GalN/LPS Hepatitis Modell durch TNF induzierte Apoptose der Hepatozyten verursacht wird (Tiegs et al., 1989). Da die Pio Administration entgegen den Erwartungen zu einer erhöhten GalN/LPS induzierten Leberschädigung beitrug, sollte untersucht werden, ob dieses ebenfalls auf TNF zurückzuführen ist. Aus diesem Grund wurde mit Pio gefütterten, TNF-Rezeptor I defizienten Mäusen GalN/LPS i.p. injiziert. Im Gegensatz zu C57BL/6 Mäusen entwickelten TNFR1^{-/-} Tiere keinen Leberschaden, wie die ALT-Werte in Abbildung IV.18 zeigen. Dieses deutet darauf hin, dass TNF der Mediator für die erhöhte Leberschädigung in Pio behandelten Tieren ist.

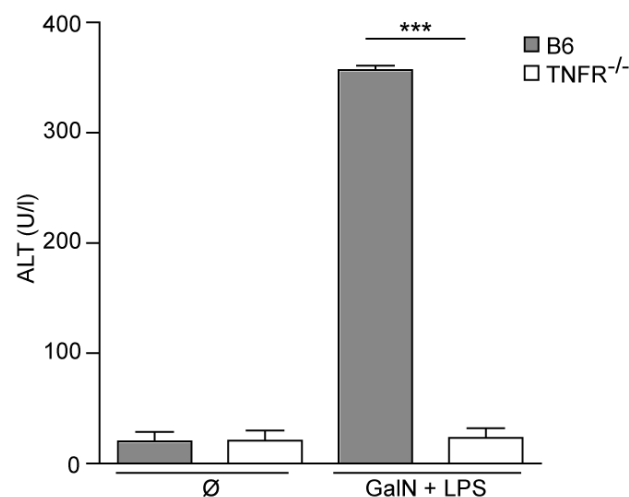


Abb. IV.18 Induktion der GalN/LPS Hepatitis in TNFR1 Knockout Mäusen

C57BL/6 bzw. TNFR1^{-/-} Mäusen wurde 7 Tage lang Pio p.o. verabreicht und anschließend GalN/LPS i.p. injiziert. Der Schweregrad des Leberschadens wurde 6 Std. später über die ALT-Menge im Blut bestimmt. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SD eines repräsentativen Experiments aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=4 Mäusen; (Ø: PBS, graue Balken: C57BL/6, weiße Balken: TNFR1^{-/-}).

Die Ergebnisse suggerieren, dass Pio in der Leber eine erhöhte, LPS vermittelte TNF Sekretion induziert. Um herauszufinden welche Zellen durch eine PPAR γ Aktivierung reaktiver werden, wurde zunächst untersucht welche Zellpopulationen LPS bedingt TNF exprimieren. Dazu wurde C57BL/6 Mäusen GalN/LPS i.p. injiziert und nach 2 Std. in verschiedenen Zelltypen TNF intrazellulär gefärbt.

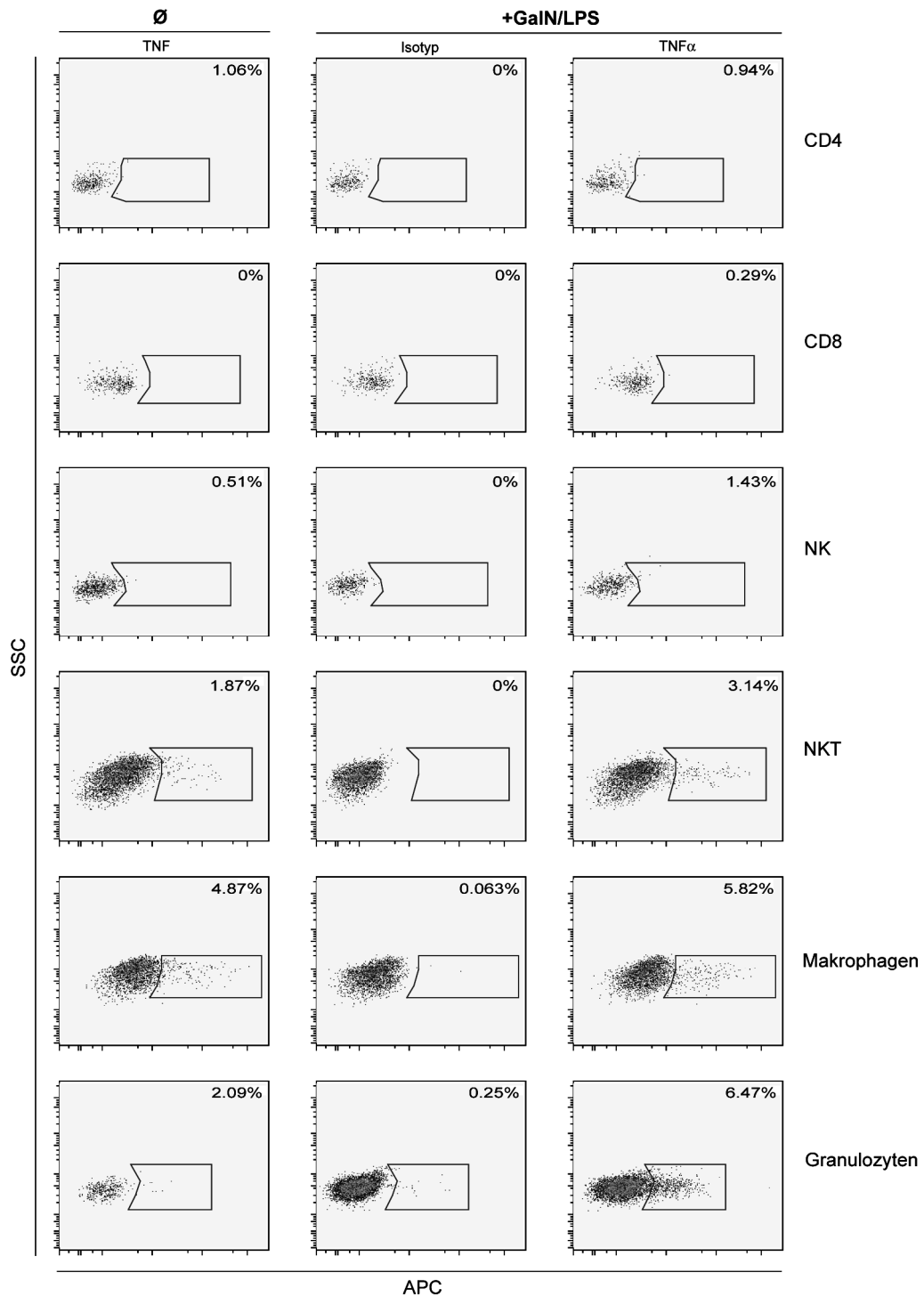


Abb.IV.19 LPS induzierte TNF-Produktion hepatischer Zellpopulationen

GalN (20 mg)/LPS (100 ng) bzw. PBS wurde C57BL6 Mäuse i.p. injiziert, nach 2 Std. wurde den Tieren die Leber entnommen, diese mit Kollagenase verdaut und das Zellgemisch mit folgenden fluoreszenz-markierten Antikörpern inkubiert: CD4-FITC, CD8-PerCP-Cy5.5, CD3-PerCP-Cy5.5, NK1.1-PE, CD11b-PE, F4/80-PerCP-Cy5.5 und Ly6G-FITC. Anschließend wurde TNF-APC intrazellulär gefärbt. Gegatet wurde jeweils auf die nebenstehenden Zellen, der Anteil an TNF-positiven Zellen ist prozentual angegeben. (Ø: PBS)

Weder in CD4 oder CD8 T Zellen, noch in NK Zellen konnte eine TNF Produktion nach LPS Applikation festgestellt werden. Dagegen wurde die TNF Expression in NK Zellen und Makrophagen durch LPS Stimulation im Verhältnis zur unstimulierten Kontrolle leicht erhöht, wobei die stärkste LPS vermittelte Induktion der Zytokinproduktion in (neutrophilen) Granulozyten zu beobachten war (Abb.IV.19).

Im Folgenden sollte geklärt werden, welche Auswirkungen die systemische Verteilung von Pio auf die LPS vermittelte Einwanderung und Aktivierung von (neutrophilen) Granulozyten in der Leber hat. Folglich wurde Pio bzw. Cmc gefütterten C57BL/6 Mäusen LPS injiziert und nach 2 Std. die Anzahl an Granulozyten im Lebergewebe bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass in Pio behandelten Tieren die Anzahl eingewanderter Granulozyten höher war, als die in Lebern von Kontrolltieren (Abb. IV.20A). Zudem war der Anteil TNF exprimierender Granulozyten in Tieren, die Pio erhalten hatten, größer als in den Vergleichstieren, wobei dieser Effekt LPS unabhängig war (Abb. IV.20B). Diese Daten weisen darauf hin, dass die Pio induzierte, erhöhte TNF Konzentration in der Leber durch Granulozyten hervorgerufen wird.

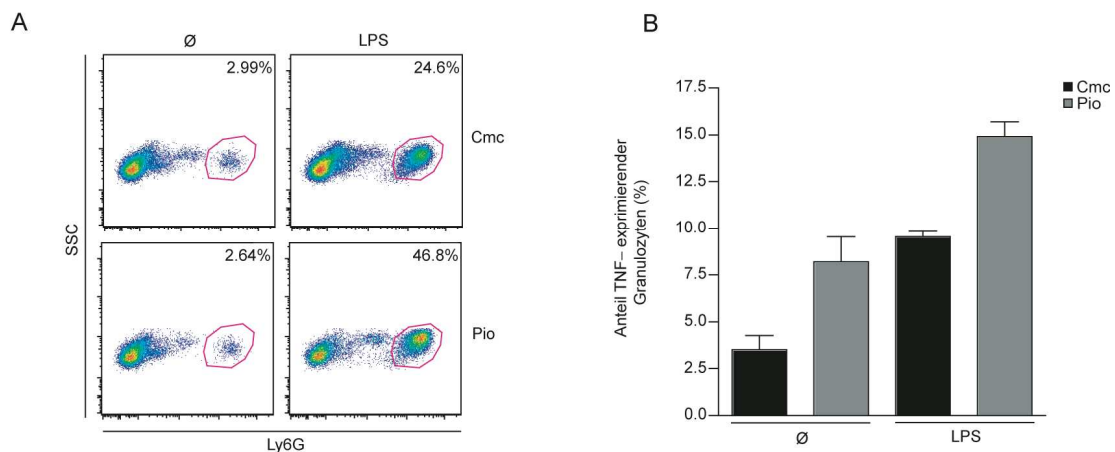


Abb. IV.20 Einfluss der PPAR γ Aktivierung auf Granulozyten

C57BL/6 Mäuse wurden 7 Tage mit Pio bzw. Cmc p.o. gefüttert. An Tag 8 wurde den Tieren LPS (10 μ g) i.p. injiziert, nach 2 Std. die Lebern entnommen und mit Kollagenaselösung verdaut. Anschließend wurde der Anteil an Ly6G⁺ Zellen (A) und an Ly6G⁺-TNF⁺ Zellen (B) durchflusszytometrisch bestimmt und prozentual dargestellt. Gezeigt sind die Daten eines von zwei unabhängigen Experimenten mit 4 Mäusen (n=4). B) Das Diagramm zeigt die Mittelwerte \pm SD; (\emptyset : PBS, schwarze Balken: Cmc, graue Balken: Pio).

In einem *in vivo* Granulozyten Depletionsexperiment sollte der Vermutung nachgegangen werden, dass PPAR γ aktivierte Granulozyten den TNF Spiegel in der Leber erhöhen. In mit Pio gefütterten C57BL/6 Mäusen wurden Granulozyten durch Applikation eines rekombinanten anti-Ly6G-Antikörpers depletiert (Abb. IV.21A), bevor eine GalN/LPS Hepatitis induziert wurde. Unerwarteterweise führte die Depletion der Granulozyten zu einer Verstärkung des negativen Einflusses von Pio auf den Krankheitsverlauf der Hepatitis, was sich in einer starken Erhöhung der ALT-Werte von 500 ng/ml auf 1800 ng/ml dieser Tiere widerspiegelte (Abb. IV.21B). Die gewonnenen Daten lassen darauf schließen, dass (neutrophile) Granulozyten in der GalN/LPS vermittelten Leberentzündung Pio behandelte Tiere nicht für den ausgeprägteren Leberschaden verantwortlich sind, sondern im Gegenteil scheinbar eher eine protektive Funktion einnehmen.

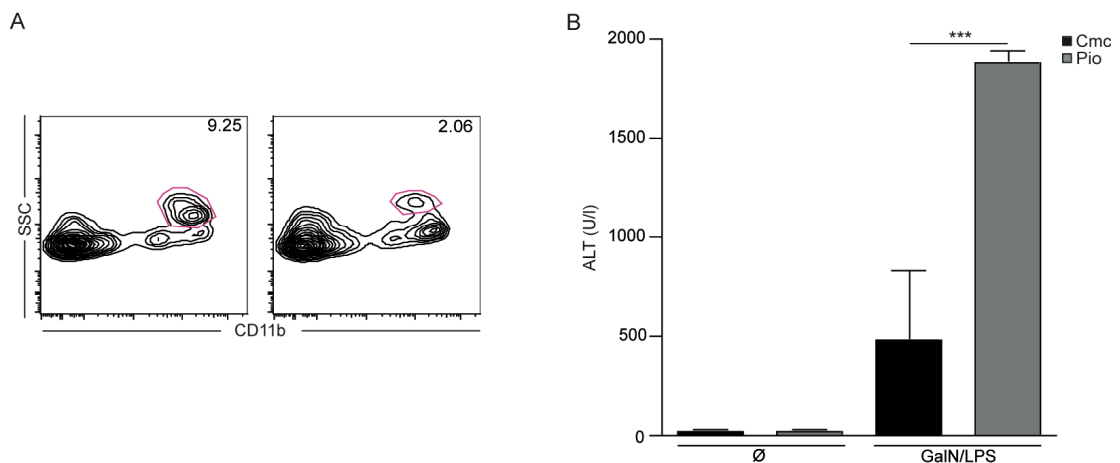


Abb. IV.21 GalN/LPS-Hepatitis in mit Pioglitazon-behandelten, Ly6G-depletierten C57BL/6 Mäusen

In mit Pio gefütterten C57BL/6 Mäusen wurden Granulozyten durch zweimalige Injektion (2 Tage und 1 Std. vor Hepatitisinduktion) eines anti-Ly6G-Antikörpers (480 μ g/Maus) depletiert, bevor 20 mg GalN mit 10 ng LPS i.p. gespritzt wurde. Nach 8 Std. wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen, die Depletion mittels Durchflusszytometrie kontrolliert (A) und die ALT-Werte gemessen (B). A) Gezeigt sind repräsentative *Dot Blots* einer Maus von vier aus zwei unabhängigen Experimenten, die Granulozytenpopulation ist rot gekennzeichnet. B) Repräsentative Daten aus zwei unabhängigen Experimenten mit 4 Mäusen sind dargestellt (n=4); (Ø: PBS, schwarze Balken: Cmc, graue Balken: Pio).

Makrophagen sowie Kupffer Zellen sind im GalN/LPS Modell die wichtigsten TNF-Quellen (Chensue et al., 1991; Freudenberg and Galanos, 1991). Diese Tatsache suggeriert, dass insbesondere Kupffer Zellen und nicht Granulozyten zur vermehrten intrahepatischen TNF Expression beitragen und somit den durch GalN und LPS induzierten Leberschaden in mit Pio behandelten Tieren verstärken könnten.

Um diese Frage zu klären, wurden Makrophagen in mit Pio und Vehikel gefütterten Mäusen durch die Injektion von Clodronat Liposomen (Cl₂MBP) depletiert, bevor GalN/LPS appliziert wurde. Das Fehlen von Kupffer Zellen, der leberspezifischen Makrophagenpopulation, hemmte nicht nur die GalN/LPS vermittelte TNF Expression, sondern hob auch den weiteren, Pio bedingten Anstieg der intrahepatischen TNF Konzentration auf (Abb. IV.22A). Aufgrund der Relevanz von TNF in diesem Hepatitis Modell war zu erwarten, dass die Apoptose der Hepatozyten durch die Depletion der Kupffer Zellen gemäßigt oder sogar verhindert wird. Tatsächlich entwickelten mit Cl₂MBP behandelte Tiere keinen GalN/LPS vermittelten Leberschaden, wie die ALT-Level in Abbildung IV.22B zeigen. Demzufolge sind Kupffer Zellen die Hauptquelle der GalN/LPS-bedingten intrahepatischen TNF Sekretion. Zudem scheint die pharmakologische PPAR γ Aktivierung durch Pio die Kupffer Zellen für eine LPS Stimulation *in vivo* zu sensibilisieren. Dieses lässt vermuten, dass das gesteigerte TNF Niveau in der Leber die mögliche Ursache für die erhöhte Leberschädigung in mit Pio behandelten Tieren ist.

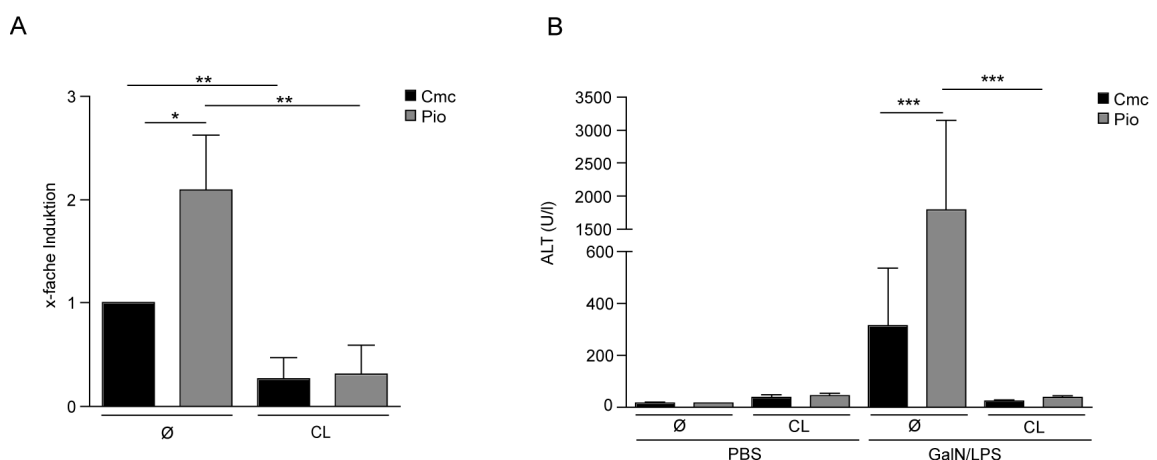


Abb. IV.22 Pioglitazon potenziert die Reaktivität von Kupffer Zellen

Mit Pio bzw. Cmc gefütterten C57BL/6 Mäusen wurden an Tag -3 und Tag -1 Cl₂MBP- bzw. PBS-Liposomen (50 µg/Maus) i.v. injiziert. A) An Tag 0 wurde GalN (20 mg) in Kombination mit LPS (10 ng) i.p. gespritzt. Nach 1 Std. wurden Leberproben entnommen, die RNA hieraus aufgereinigt, diese in cDNA umgeschrieben und eine *Real-Time-PCR* durchgeführt. Dargestellt ist die Induktion der TNF Expression, bezogen auf die Expressionslevel von TNF in Lebern Cmc gefütterter, nicht depletierter Tiere (Wert=1). Gezeigt ist jeweils der Mittelwert ± SD eines repräsentativen Experiments von zwei unabhängigen Experimenten mit 3 Mäusen (n=3). B) 8 Std. nach intraperitonealer Injektion von GalN (20 mg) mit LPS (20 ng) wurden die Serum-ALT-Werte bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ± SD eines repräsentativen Experiments aus zwei unabhängigen Experimenten mit 3 Mäusen (n=3); (∅: PBS-Liposomen, CL: Clodronat-Liposomen, schwarze Balken: Cmc, graue Balken: Pio).

Wäre die Pio bedingte Verschlechterung des Krankheitsverlaufs ausschließlich auf die erhöhte TNF Ausschüttung zurückzuführen, sollte sich die Verwendung von rekombinantem TNF anstatt LPS in Kombination mit GalN gleichermaßen auf den Leberschaden auswirken, unabhängig davon, ob zuvor Pio verabreicht wurde oder nicht. Diese Annahme ließ sich allerdings nicht bestätigen. Vielmehr bewirkte die Injektion identischer TNF-Mengen signifikant erhöhte ALT-Level im Serum der mit Pio gefütterten Mäuse (320 U/L) im Vergleich zu den Kontrolltieren (120 U/L) (Abb. IV.23A). Verursacht wurde dieses entweder durch die Sensibilisierung von Hepatozyten gegenüber der TNF induzierten Apoptose oder dadurch, dass TNF selbst dessen Expression über einen autokrinen Mechanismus steigert und dadurch eine erhöhte Schädigung der Leber erfolgt.

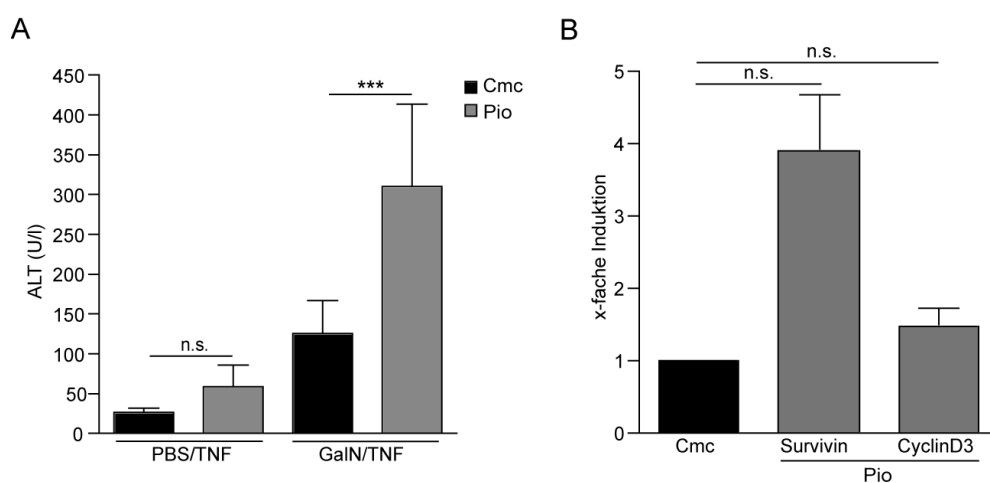


Abb. IV.23 Pioglitazon sensibilisiert Hepatozyten für TNF vermittelte Apoptose

C57BL/6 Mäusen wurde 7 Tage lang Cellulose oder Pioglitazon p.o. verabreicht und anschließend PBS bzw. GalN (20 mg/Maus) i.p. gespritzt. A) Nach 30 Min. wurde den Mäusen 400 ng/Maus rekombinantes TNF intravenös appliziert und 4 Std. später die ALT-Werte bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD von einem repräsentativen Experiment aus drei unabhängigen Experimenten mit 4 Mäusen (n=4); B) Den Mäusen wurden nach 1 Std. Leberproben entnommen, aus denen die RNA aufgereinigt und in cDNA umgeschrieben wurde. Anschließend wurde eine *Real-Time-PCR* durchgeführt. Dargestellt ist die Induktion der Survivin und CyclinD3 Expression, bezogen auf die Expression dieser Proteine in Lebern Cmc gefütterter Mäuse (Wert=1). Gezeigt ist jeweils der Mittelwert \pm SD eines repräsentativen Experiments von zwei unabhängigen Experimenten mit 3 Mäusen (n=3); (n.s.: nicht signifikant, schwarze Balken: Cmc, graue Balken: Pio).

Das Thiazolidindion Troglitazon reduziert unabhängig von PPAR γ die CyclinD3 mRNA-Level sowie die Expression des antiapoptotischen Proteins Survivin, wodurch die Apoptoseinduktion begünstigt wird (Lu et al., 2005). Im Folgenden wurde untersucht, ob die durch Pio verursachte Sensibilisierung der Hepatozyten gegenüber einer TNF induzierten Apoptose ebenfalls mit einer verringerten Expression von CyclinD3 oder Survivin in Zusammenhang steht. Zu diesem Zweck wurden Pio oder Cmc gefütterten C57BL/6 Mäusen eine Std. nach einer GalN/LPS Injektion Leberproben entnommen und die mRNA Level der oben genannten Proteine verglichen. Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei einer Behandlung mit Troglitazon, zeigte sich in den Lebern Pio gefütterter Mäuse eher eine Steigerung der Expression von Survivin. Die mRNA Level von CyclinD3 blieben unverändert (Abb.IV.23B))

Diese Ergebnisse bieten neue Einblicke in den Mechanismus der durch Pio verursachten Leberschädigung und verdeutlichen wie vielfältig die Wirkung dieses Medikamentes auf unterschiedliche Zellpopulationen ist.

V. Diskussion

1. Zellintrinsische Wirkungen der PPAR γ Aktivierung auf LSEC

Die pharmakologische Regulation hepatischer Immunzellen könnte dazu beitragen, durch Autoimmunität oder überschießende Immunreaktionen verursachte Schädigungen des Lebergewebes zu verhindern. Obwohl PPAR γ ursprünglich als Regulator der Adipozytendifferenzierung und des Glukosemetabolismus identifiziert wurde (Desvergne and Wahli, 1999), besteht in jüngster Zeit das wissenschaftliche Interesse an PPAR γ vor allem an der Untersuchung des Einflusses spezifischer PPAR γ Liganden auf Mechanismen der Immunregulation. Die zellintrinsische, antiinflammatorische Wirkung von PPAR γ in verschiedenen Immunzellen, wie Makrophagen und T Zellen, wurde bereits gezeigt (Klotz et al., 2007; Ricote et al., 1998; Wang et al., 2001). Dabei beruht dieser Einfluss von PPAR γ maßgeblich auf der Inhibition der Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP1, welche die Expression proinflammatorischer Gene induzieren. In dieser Arbeit wurde der differenzielle Einfluss einer pharmakologischen PPAR γ Aktivierung auf die immunogenen bzw. tolerogenen Funktionen sessiler, hepatischer, antigenpräsentierender Zellen gezeigt.

PPAR γ reduziert die Reaktivität von LSEC gegenüber einer LPS Stimulation

Professionelle APC, wie DC, werden hinsichtlich ihrer Reaktivität nach einer Stimulation mit LPS durch PPAR γ gehemmt, was sich in einer verminderten IL12 Sekretion zeigt (Klotz et al., 2007). Die Aktivierung von PPAR γ wirkte in LSEC ebenfalls inhibierend auf eine LPS induzierte Zytokinproduktion. Wobei die IL6 Sekretion von LSEC durch die Behandlung mit Pio nicht vollständig unterbunden wurde, sondern herunter reguliert wurde. Möglicherweise ist dieses darauf zurück zu führen, dass LSEC konstitutiv Prostaglandine produzieren und deren Produktion durch Endotoxine noch verstärkt wird (Rieder et al., 1990). Die Leber wird maßgeblich durch venöses Blut des Gastrointestinaltraktes gespeist, welches unter anderem physiologische Mengen an LPS mit sich führt. Dies resultiert in einer kontinuierlichen PPAR γ Aktivierung, da Prostaglandine zu den endogenen PPAR γ Liganden zählen (Forman et al., 1995; Kliewer

et al., 1995; Yu et al., 1995). Sind diese konstitutiv in der Zelle vorhanden, ist es möglich, dass eine zusätzliche Stimulation von PPAR γ durch Pio nur einen geringen antiinflammatorischen Effekt zeigt. Des Weiteren kann das Prostaglandin PGJ₂ die Aktivität von NF κ B unabhängig von PPAR γ reprimieren. Dieses geschieht einerseits über die direkte Inhibition des I κ B Kinasekomplexes, andererseits über die Alkylierung des p50-p65 NF κ B Heterodimers (Castrillo et al., 2000; Straus et al., 2000). Diese PPAR γ unabhängige Wirkung könnte einen weiteren Anhaltspunkt für die geringe Effektivität einer pharmakologischen PPAR γ Aktivierung auf die LPS induzierte Zytokinausschüttung von LSEC darstellen.

Die tolerogenen Eigenschaften von LSEC werden durch die Aktivierung von PPAR γ nicht beeinträchtigt

Die Aktivierung von PPAR γ in DC äußert sich nicht nur in einer verringerten, LPS vermittelten Zytokinexpression, sondern nimmt auch Einfluss auf die immunogenen Eigenschaften gegenüber von CD4 T Zellen. Die Proliferation und Aktivierung von CD4 T Zellen wird durch eine PPAR γ Aktivierung in DC gehemmt (Klotz et al., 2007). Die durch LSEC induzierte Proliferation und Toleranz von CD8 T Zellen wurde durch die Pio vermittelte Aktivierung von PPAR γ hingegen nicht beeinflusst, obwohl die Expression des für die tolerogene Funktion von LSEC essentielle, koinhibitorische Oberflächenmolekül B7H1 (Diehl et al., 2008) durch die Aktivierung von PPAR γ herab gesetzt wird. Diese Beobachtung verdeutlicht die differenzielle Wirkung von PPAR γ auf verschiedene APC, da im Gegensatz dazu die Liganden induzierte Aktivierung von PPAR γ in DC des Knochenmarks die B7H1 Expression steigert. Parallel dazu wird durch die Pio Administration die Expression des Mannose-Rezeptors erhöht und damit einhergehend die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation in DC gesteigert (Klotz et al., 2009b). Die Kreuzpräsentation bzw. Präsentation exogener Antigene in LSEC hingegen wird durch die Aktivität von PPAR γ vermindert. Dieses könnte darauf zurück zu führen sein, dass sich der zugrundeliegende Mechanismus von dem in DC unterscheidet. In DC geschieht die Aufnahme exogener Antigene über den Mannose-Rezeptor, ist dieser nicht vorhanden, findet keine Kreuzpräsentation statt (Burgdorf et al., 2007; Burgdorf et al., 2006). In LSEC basiert die Aufnahme exogener Antigene für die

Kreuzpräsentation auf der Rezeptor vermittelten Endozytose, wobei der Mannoserezeptor nicht relevant ist (Schurich et al., 2009). Für die LSEC vermittelte Toleranzinduktion in T Zellen ist die Balance zwischen B7H1 Expression und der Anzahl beladener MHC Moleküle von großer Bedeutung (Schurich et al., 2010). Die mit Pio Administration einhergehende Inhibition der Kreuzpräsentation und parallele Verringerung der Expressionslevel von B7H1, könnten die tolerogenen Eigenschaften von LSEC aufrechterhalten. Da in der Leber unter homöostatischen Bedingungen eine Reihe von endogenen PPAR γ Liganden wie z.B. Prostaglandine vorhanden sind, könnte die kontinuierliche Aktivierung von PPAR γ in den Immunzellen der Leber zu ihrem immunsuppressiven Milieu beitragen.

2. Die Aktivierung von PPAR γ nimmt keinen Einfluss auf die durch Concanavalin A induzierte Immunhepatitis

Tiefere Einblicke in die Wirkung von PPAR γ auf die Immunregulation in der Leber wurden durch die pharmakologische PPAR γ Aktivierung in zwei unterschiedlichen Modellen einer Immunhepatitis gewonnen. Die Injektion von ConA aktiviert eine Vielzahl hepatischer Immunzellen, unter anderem T Zellen sowie Kupffer Zellen. Der dadurch induzierte Zytokinsturm resultiert schließlich in einem durch TNF vermittelten Leberschaden (Erhardt and Tiegs, 2010; Gantner et al., 1995). Die Aktivierung von PPAR γ in Makrophagen verringert deren Reaktivität gegenüber proinflammatorischen Stimuli (Glass and Ogawa, 2006).

Die Aktivierung von PPAR γ nimmt keinen Einfluss auf den Verlauf einer ConA induzierten Immunhepatitis

PPAR γ ist ein negativer Regulator in der Differenzierung von T_H17 Zellen (Klotz et al., 2009a). T_H17 Zellen spielen eine wichtige Rolle in chronischen Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, *inflammatory bowel disease* (IBD) oder der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) (Caprioli et al., 2008; Fletcher et al., 2010; Fujino et al., 2003; Komiyama et al., 2006; Lubberts, 2003).

Der Einfluss von IL17 auf eine ConA Hepatitis wird bisweilen kontrovers diskutiert. Einerseits wurde gezeigt, dass IL17 defiziente Mäuse während einer ConA induzierten Hepatitis ähnlich schwere Leberschäden entwickeln wie Wildtyp Mäuse. Diese Beobachtung spricht gegen den Einfluss von T_H17 Zellen in diesem Modell (Zenewicz et al., 2007). Die ConA Experimente von zwei anderen Arbeitsgruppen ergaben hingegen reduzierte Organschäden in Lebern von IL17 *Knockout* Mäusen verglichen mit Lebern von Wildtyp Mäusen (Lafdil et al., 2009; Nagata et al., 2008). Die Differenzierung naiver CD4 T Zellen in T_H17 Zellen wird durch IL21 sowie IL6 in Kombination mit TGFβ initiiert (Korn et al., 2007). Dem Transkriptionsfaktor RORγt fällt dabei eine Schlüsselrolle zu. Dieser wird durch IL6 und TGFβ induziert und ist für die Differenzierung von T_H17 Zellen essentiell (Ivanov et al., 2006; Yang et al., 2008). PPARγ reguliert die Differenzierung von T_H17 Zellen über die Inhibition der RORγt Expression, indem es den transkriptionell inhibitorischen NCoR³⁸/SMRT³⁹ Komplex an der Promotorregion des RORγt Gens stabilisiert (Ghisletti et al., 2009; Klotz et al., 2009a). Dieser Regulationsmechanismus könnte den verringerten Grad der Beschwerden bzw. den verzögerten Krankheitsverlauf, die bei einer IBD oder EAE durch die pharmakologische PPARγ Aktivierung mittels Pioglitazon hervorgerufen werden (Feinstein et al., 2002; Guri et al., 2010), für die ConA Hepatitis allerdings nicht beobachtet werden konnten, erklären. Im Gegensatz zu chronischen Erkrankungen wie IBD oder EAE erfolgt nach einer ConA Injektion unverzüglich die Induktion immunologischer Effektormechanismen. Aufgrund des kurzen Zeitintervalls sind daran maßgeblich bereits ausdifferenzierte T Zellen beteiligt. Dadurch kommt die transkriptionelle Regulation der T_H17 Differenzierung durch PPARγ in diesem Modell nicht zum Tragen. Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass die Aktivierung von PPARγ keinen signifikanten Einfluss auf die Regulation der ConA induzierten Immunhepatitis nimmt.

Die Aktivierung von PPARγ reduziert die Reaktivität von T Zellen

Obwohl der Verlauf der T Zell abhängigen ConA Hepatitis durch PPARγ nicht beeinflusst wurde, wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die pharmakologische PPARγ

³⁸ engl. *nuclear corepressor*

³⁹ engl. *silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor*

Aktivierung in T Zellen deren IFN γ und TNF Sekretion nach Stimulation einschränkt. Die Stimulation des TCR/CD3-Komplexes resultiert in der Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, welche die Expression proinflammatorischer Moleküle nach sich ziehen. Einer der Transkriptionsfaktoren ist NF κ B. Dieser wird durch die Aktivierung von PPAR γ inhibiert, was eine Reduktion der Reaktivität der T Zelle zur Folge hat. Da die T Zell Stimulation aber nicht ausschließlich über NF κ B reguliert wird, liegt die Effektivität von PPAR γ bei etwa 40%. Trotz dieses inhibitorischen Einflusses von PPAR γ auf die T Zell Aktivierung, wurde der Verlauf einer ConA Hepatitis durch die systemische Verabreichung von Pioglitazon nicht verbessert. Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass die Funktion von PPAR γ in T Zellen für den Verlauf der akuten Immunhepatitis nicht relevant ist. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass eine ConA Hepatitis in CD4Cre⁺ x PPAR $\gamma^{fl/fl}$ Mäusen, die einen T Zell spezifischen PPAR γ Knockout aufweisen, keine erhöhte Schädigung des Lebergewebes zur Folge hat.

3. Pioglitazon verstärkt den Leberschaden während einer experimentellen Hepatitis

Obwohl eine systemische PPAR γ Aktivierung durch Pio das Ausmaß der ConA vermittelten Leberschädigung nicht beeinflusste, zeigten Pio behandelte Mäuse eine erhöhte TNF mRNA Expression in der Leber im Vergleich zu den Kontrolltieren. Um zu untersuchen, ob die Behandlung mit Pio möglicherweise die Symptome einer Leberentzündung verschärfen könnte, wurde ein weiteres Modell einer experimentellen Hepatitis verwendet; die kombinierte Injektion von GalN und LPS (Galanos et al., 1979). Es zeigte sich, dass durch die Administration von Pio der durch GalN und LPS induzierte Leberschaden verstärkt wurde und dieses mit einer Steigerung der intrahepatischen TNF mRNA Level einher ging. In der GalN/LPS vermittelten Hepatitis ist die TNF Ausschüttung von Kupffer Zellen der wesentliche, pathologische Faktor (Leist et al., 1995). Die Depletion von Kupffer Zellen veranschaulichte, dass die durch Pio Administration erhöhten TNF Level auf einer erhöhten Reaktivität der

Kupffer Zellen beruhen. Es scheint verwunderlich, dass in den beiden verwendeten Hepatitismodellen der Leberschaden über TNF induziert wurde, eine systemische PPAR γ Aktivierung durch Pio aber ausschließlich in der GalN/LPS vermittelten Hepatitis vermehrtes Sterben der Hepatozyten hervorrief. Diese Beobachtung lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass in Hepatozyten unterschiedliche Signalkaskaden durch die Bindung von TNF an den TNFR1 initiiert werden. Für den GalN/LPS vermittelten Leberschaden ist die Aktivierung der Caspase 3 essentiell. Die Signaltransduktion erfolgt über FADD, Caspase 8 und 9 und resultiert in der Spaltung von Caspase 3, was schließlich zur Induktion von Apoptose in den Hepatozyten führt (Bradham et al., 1998b; Kunstle et al., 1999; Streetz et al., 2000). Parallel dazu wird ein NF κ B abhängiger antiapoptotischer Signalweg initiiert, der dem Absterben der Hepatozyten entgegen wirkt (Kunstle et al., 1999). Da PPAR γ durch Transrepression inhibitorisch auf NF κ B wirkt (Ricote and Glass, 2007), wird der antiapoptotische Signalweg blockiert und die Apoptose der Hepatozyten begünstigt.

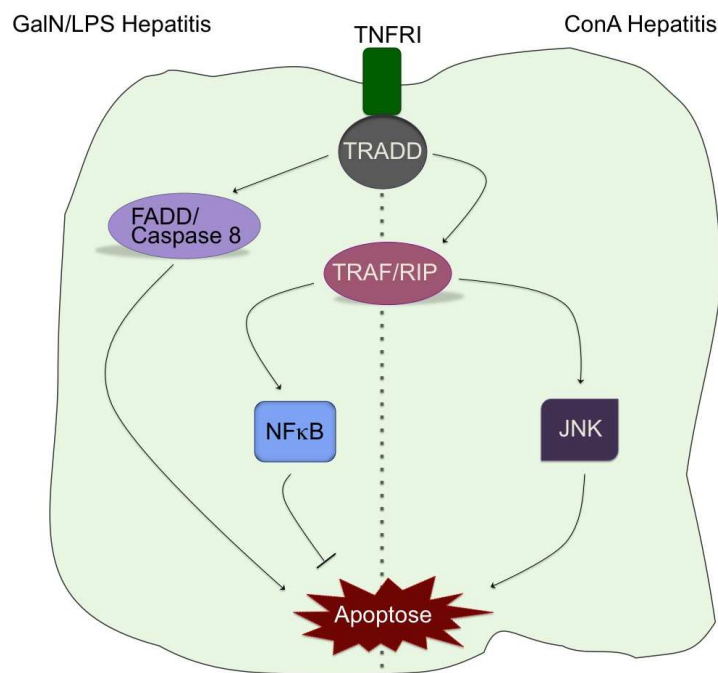


Abb. V.1 Vereinfachte Übersicht über die Signaltransduktion des TNFR1 in Hepatozyten

Der GalN/LPS vermittelte Leberschaden verläuft über die Caspasen Kaskade. Die Aktivierung NF κ B-abhängiger antiapoptotischer Proteine wirkt der Induktion der hepatischen Apoptose entgegen. Im Verlauf einer ConA-Hepatitis erfolgt die Induktion der Apoptose in Hepatozyten über den MAPK/JNK Signalweg.

In einer ConA Hepatitis beruht der Leberschaden hingegen auf der Aktivierung von IRF1 und JNK. NFκB bzw. die FADD/Caspase 8 Kaskade sind in diesem Modell für die Schädigung der Hepatozyten nicht relevant (Streetz et al., 2001). Die Verstärkung des apoptotischen Signalweges durch die Inhibition des NFκB-abhängigen protektiven Signalweges durch PPARγ kommt dadurch in diesem Modell nicht zum Tragen.

Eine weitere Erklärung dafür, dass sich Pio negativ auf einen GalN/LPS induzierten Leberschaden auswirkt, die ConA vermittelte Hepatitis aber nicht beeinflusst wird, könnte die Sensitivierung der Hepatozyten durch GalN sein. Die Injektion von GalN führt durch die Hemmung der Transkription zu einer reduzierten Biosynthese von Makromolekülen wie beispielsweise RNA, Proteinen und Glykoproteinen (Decker and Keppler, 1974). Zusätzlich können auch Veränderungen in der Struktur und Funktion der Plasmamembran hervorgerufen werden (Bachmann et al., 1977; Bauer et al., 1974).

Dadurch ist anzunehmen, dass die Apoptose der Hepatozyten durch proinflammatorische Zytokine begünstigt wird. Da im Modell der ConA Hepatitis keine hepatotoxischen Substanzen verwendet werden, sind die Hepatozyten möglicherweise unempfindlicher gegenüber der zytokinetischen Induktion von Apoptose. Dieser Vermutung wäre nachzugehen, indem eine ConA Hepatitis in durch GalN sensitivierte Mäuse induziert würde. Eine systemische PPARγ Aktivierung durch Pio könnte in diesem Fall ebenfalls zu einem erhöhten Leberschaden führen.

4. Pioglitazon sensitiviert Hepatozyten gegenüber der TNF vermittelten Apoptose

Pio gehört zu der Familie der Thiazolidindione. Ursprünglich wurde die PPARγ aktivierende Wirkung dieser Arzneimittel zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ II verwendet. Klinische Studien belegten für Troglitazon, das ebenfalls den Thiazolidindionen angehört, PPARγ unabhängige Nebeneffekte, die schwere Organschäden nach sich ziehen können (Neuschwander-Tetri et al., 1998; Watkins and

Whitcomb, 1998). Die durch Arzneimittel verursachte Leberschädigung (DILI⁴⁰) ist die Grundlage vieler Lebererkrankungen und verantwortlich für ungefähr die Hälfte aller Fälle akuten Leberversagens (Kaplowitz, 2001). Der zugrundeliegende Mechanismus ist allerdings noch nicht vollständig erforscht. Es wird zwischen einer direkten, hepatotoxischen Wirkung und idiosynkratischen Hyperimmunreaktionen unterschieden, wobei in den meisten Fällen die Umsetzung der Medikamente in toxische Metabolite Ursache der DILI ist (Holt and Ju, 2006). Während der Metabolisierung von Troglitazon entstehen chemisch reaktive Metabolite, die zur Apoptose in Hepatozyten führen können (Ikeda, 2010). Für Pio sind bislang keine schwerwiegenden hepatotoxischen Effekte bekannt. Dennoch zeigte die kombinierte Administration von TNF und GalN eine erhöhte Leberschädigung in mit Pio behandelten Mäusen. Dieses Ergebnis ist ein erster Hinweis, dass Pio in transkriptionsgehemmten Hepatozyten die inflammatorische Wirkung von TNF verstärken und eine DILI hervorrufen kann. Ob dieser Effekt auf der Aktivierung von PPAR γ beruht oder durch die unspezifische Induktion anderer Signalwege verursacht wird, bedarf weiterer Forschung. Eine Erhöhung der TRAIL⁴¹ vermittelten Apoptose durch die Reduktion der Survivin und CyclinD3 Expression, wie sie für Troglitazon bekannt ist (Lu et al., 2005), hat sich für Pio nicht bestätigt. Die Beobachtung, dass Pio die apoptotische Wirkung von TNF begünstigt, verdeutlicht die Notwendigkeit neben der toxikologischen Wirkung von Arzneimitteln auch die Auswirkungen auf die Empfindlichkeit der Zielzellen gegenüber immunologischer Faktoren zu untersuchen.

Zusammenfassend weisen die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse darauf hin, dass die Aktivierung von PPAR γ durch Pioglitazon eine Immunhepatitis nicht verhindern kann, sondern die Auswirkungen des Leberschadens verschärfen kann. Diese Form der durch Arzneimittel verstärkten Lebererkrankung bedarf weiterer Untersuchungen. Unter anderem könnte die Sensibilisierung der Hepatozyten gegenüber TNF *in vitro* untersucht werden, um intrazelluläre Mediatoren zu identifizieren. Die Auflösung des molekularen Mechanismus könnte zum weiteren Verständnis und damit zur Vermeidung unerwünschter Nebeneffekte von Medikamenten führen.

⁴⁰ engl. *drug-induced liver injury*

⁴¹ engl. *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*

VI. Referenzen

A, I.J., Jeannin, E., Wahli, W., and Desvergne, B. (1997). Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J Biol Chem* 272, 20108-20117.

Adams, M., Reginato, M.J., Shao, D., Lazar, M.A., and Chatterjee, V.K. (1997). Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *J Biol Chem* 272, 5128-5132.

Akira, S. (2006). TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 311, 1-16.

Alleva, D.G., Johnson, E.B., Lio, F.M., Boehme, S.A., Conlon, P.J., and Crowe, P.D. (2002). Regulation of murine macrophage proinflammatory and anti-inflammatory cytokines by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: counter-regulatory activity by IFN-gamma. *J Leukoc Biol* 71, 677-685.

Allison, J.P. (1994). CD28-B7 interactions in T-cell activation. *Curr Opin Immunol* 6, 414-419.

Auwerx, J. (1999). PPARgamma, the ultimate thrifty gene. *Diabetologia* 42, 1033-1049.

Baccala, R., Hoebe, K., Kono, D.H., Beutler, B., and Theofilopoulos, A.N. (2007). TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. *Nat Med* 13, 543-551.

Bachmann, W., Harms, E., Hassels, B., Henninger, H., and Reutter, W. (1977). Studies on rat liver plasma membrane. Altered protein and phospholipid metabolism after injection of D-galactosamine. *Biochem J* 166, 455-462.

Baker, P.R., Lin, Y., Schopfer, F.J., Woodcock, S.R., Groeger, A.L., Batthyany, C., Sweeney, S., Long, M.H., Iles, K.E., Baker, L.M., *et al.* (2005). Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: multiple nitrated unsaturated fatty acid derivatives exist in human blood and urine and serve as endogenous peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *J Biol Chem* 280, 42464-42475.

Bauer, C.H., Lukaschek, R., and Reutter, W.G. (1974). Studies on the golgi apparatus. Cumulative inhibition of protein and glycoprotein secretion by D-galactosamine. *Biochem J* 142, 221-230.

Beutler, B., and Cerami, A. (1989). The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* 7, 625-655.

Beyaert, R., Van Loo, G., Heyninck, K., and Vandenabeele, P. (2002). Signaling to gene activation and cell death by tumor necrosis factor receptors and Fas. *Int Rev Cytol* 214, 225-272.

Blomhoff, R., Eskild, W., and Berg, T. (1984). Endocytosis of formaldehyde-treated serum albumin via scavenger pathway in liver endothelial cells. *Biochem J* 218, 81-86.

- Bradham, C.A., Plumpe, J., Manns, M.P., Brenner, D.A., and Trautwein, C. (1998a). Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. *Am J Physiol* 275, G387-392.
- Bradham, C.A., Qian, T., Streetz, K., Trautwein, C., Brenner, D.A., and Lemasters, J.J. (1998b). The mitochondrial permeability transition is required for tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis and cytochrome c release. *Mol Cell Biol* 18, 6353-6364.
- Burgdorf, S., Kautz, A., Bohnert, V., Knolle, P.A., and Kurts, C. (2007). Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* 316, 612-616.
- Burgdorf, S., Lukacs-Kornek, V., and Kurts, C. (2006). The mannose receptor mediates uptake of soluble but not of cell-associated antigen for cross-presentation. *J Immunol* 176, 6770-6776.
- 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.
- Cantor, H.M., and Dumont, A.E. (1967). Hepatic suppression of sensitization to antigen absorbed into the portal system. *Nature* 215, 744-745.
- Caprioli, F., Pallone, F., and Monteleone, G. (2008). Th17 immune response in IBD: A new pathogenic mechanism. *J Crohns Colitis* 2, 291-295.
- Carreno, B.M., and Collins, M. (2002). The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol* 20, 29-53.
- Castrillo, A., Diaz-Guerra, M.J., Hortelano, S., Martin-Sanz, P., and Bosca, L. (2000). Inhibition of I κ B kinase and I κ B phosphorylation by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) in activated murine macrophages. *Mol Cell Biol* 20, 1692-1698.
- Chawla, A., Schwarz, E.J., Dimaculangan, D.D., and Lazar, M.A. (1994). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* 135, 798-800.
- Chensue, S.W., Terebuh, P.D., Remick, D.G., Scales, W.E., and Kunkel, S.L. (1991). In vivo biologic and immunohistochemical analysis of interleukin-1 alpha, beta and tumor necrosis factor during experimental endotoxemia. Kinetics, Kupffer cell expression, and glucocorticoid effects. *Am J Pathol* 138, 395-402.
- Chung, S.W., Kang, B.Y., Kim, S.H., Pak, Y.K., Cho, D., Trinchieri, G., and Kim, T.S. (2000). Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem* 275, 32681-32687.
- Clark, R.B., Bishop-Bailey, D., Estrada-Hernandez, T., Hla, T., Puddington, L., and Padula, S.J. (2000). The nuclear receptor PPAR gamma and immunoregulation: PPAR gamma mediates inhibition of helper T cell responses. *J Immunol* 164, 1364-1371.
- Conrad, D.J., Kuhn, H., Mulkins, M., Highland, E., and Sigal, E. (1992). Specific inflammatory cytokines regulate the expression of human monocyte 15-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 217-221.
- Crispe, I.N. (2003). Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol* 3, 51-62.

- Cunard, R., Eto, Y., Muljadi, J.T., Glass, C.K., Kelly, C.J., and Ricote, M. (2004). Repression of IFN-gamma expression by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Immunol* *172*, 7530-7536.
- Curtsinger, J.M., Johnson, C.M., and Mescher, M.F. (2003a). CD8 T cell clonal expansion and development of effector function require prolonged exposure to antigen, costimulation, and signal 3 cytokine. *J Immunol* *171*, 5165-5171.
- Curtsinger, J.M., Lins, D.C., and Mescher, M.F. (2003b). Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *J Exp Med* *197*, 1141-1151.
- Curtsinger, J.M., Schmidt, C.S., Mondino, A., Lins, D.C., Kedi, R.M., Jenkins, M.K., and Mescher, M.F. (1999). Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* *162*, 3256-3262.
- Curtsinger, J.M., Valenzuela, J.O., Agarwal, P., Lins, D., and Mescher, M.F. (2005). Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *J Immunol* *174*, 4465-4469.
- Daynes, R.A., and Jones, D.C. (2002). Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* *2*, 748-759.
- Decker, K., and Keppler, D. (1972). Galactosamine induced liver injury. *Prog Liver Dis* *4*, 183-199.
- Decker, K., and Keppler, D. (1974). Galactosamine hepatitis: key role of the nucleotide deficiency period in the pathogenesis of cell injury and cell death. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 77-106.
- Desvergne, B., and Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* *20*, 649-688.
- 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.
- Diehl, L., Schurich, A., Grochtmann, R., Hegenbarth, S., Chen, L., and Knolle, P.A. (2008). Tolerogenic maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7-homolog 1-dependent CD8+ T cell tolerance. *Hepatology* *47*, 296-305.
- Dinareello, C.A., Okusawa, S., and Gelfand, J.A. (1989). Interleukin-1 induces a shock-like state in rabbits: synergism with tumor necrosis factor and the effect of ibuprofen. *Prog Clin Biol Res* *299*, 203-215.
- Dreyer, C., Krey, G., Keller, H., Givel, F., Helftenbein, G., and Wahli, W. (1992). Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* *68*, 879-887.
- Erhardt, A., Biburger, M., Papadopoulos, T., and Tiegs, G. (2007). IL-10, regulatory T cells, and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver injury in mice. *Hepatology* *45*, 475-485.

- Erhardt, A., and Tiegs, G. (2010). Tolerance induction in response to liver inflammation. *Dig Dis* 28, 86-92.
- Faveeuw, C., Fougeray, S., Angeli, V., Fontaine, J., Chinetti, G., Gosset, P., Delerive, P., Maliszewski, C., Capron, M., Staels, B., *et al.* (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit interleukin-12 production in murine dendritic cells. *FEBS Lett* 486, 261-266.
- Feinstein, D.L., Galea, E., Gavriilyuk, V., Brosnan, C.F., Whitacre, C.C., Dumitrescu-Ozimek, L., Landreth, G.E., Pershadsingh, H.A., Weinberg, G., and Heneka, M.T. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists prevent experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol* 51, 694-702.
- Fitzgerald, K.A., Rowe, D.C., Barnes, B.J., Caffrey, D.R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P.M., and Golenbock, D.T. (2003). LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* 198, 1043-1055.
- Fletcher, J.M., Lalor, S.J., Sweeney, C.M., Tubridy, N., and Mills, K.H. (2010). T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol* 162, 1-11.
- Forman, B.M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R.P., Spiegelman, B.M., and Evans, R.M. (1995). 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 83, 803-812.
- Freeman, B.A., Baker, P.R., Schopfer, F.J., Woodcock, S.R., Napolitano, A., and d'Ischia, M. (2008). Nitro-fatty acid formation and signaling. *J Biol Chem* 283, 15515-15519.
- Freudenberg, M.A., and Galanos, C. (1990). Bacterial lipopolysaccharides: structure, metabolism and mechanisms of action. *Int Rev Immunol* 6, 207-221.
- Freudenberg, M.A., and Galanos, C. (1991). Tumor necrosis factor alpha mediates lethal activity of killed gram-negative and gram-positive bacteria in D-galactosamine-treated mice. *Infect Immun* 59, 2110-2115.
- Fujino, S., Andoh, A., Bamba, S., Ogawa, A., Hata, K., Araki, Y., Bamba, T., and Fujiyama, Y. (2003). Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52, 65-70.
- Galanos, C., Freudenberg, M.A., and Reutter, W. (1979). Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 5939-5943.
- Gantner, F., Leist, M., Lohse, A.W., Germann, P.G., and Tiegs, G. (1995). Concanavalin A-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice: the role of tumor necrosis factor. *Hepatology* 21, 190-198.
- Ghisletti, S., Huang, W., Jepsen, K., Benner, C., Hardiman, G., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (2009). Cooperative NCoR/SMRT interactions establish a corepressor-based strategy for integration of inflammatory and anti-inflammatory signaling pathways. *Genes Dev* 23, 681-693.
- Glass, C.K., and Ogawa, S. (2006). Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 6, 44-55.

- Gosset, P., Charbonnier, A.S., Delerive, P., Fontaine, J., Staels, B., Pestel, J., Tonnel, A.B., and Trottein, F. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators affect the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* *31*, 2857-2865.
- Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P. (1995). The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* *83*, 793-802.
- Grell, M., Wajant, H., Zimmermann, G., and Scheurich, P. (1998). The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 570-575.
- Guicciardi, M.E., Deussing, J., Miyoshi, H., Bronk, S.F., Svingen, P.A., Peters, C., Kaufmann, S.H., and Gores, G.J. (2000). Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J Clin Invest* *106*, 1127-1137.
- Guri, A.J., Mohapatra, S.K., Horne, W.T., 2nd, Hontecillas, R., and Bassaganya-Riera, J. (2010). The role of T cell PPAR gamma in mice with experimental inflammatory bowel disease. *BMC Gastroenterol* *10*, 60.
- Hanefeld, M. (2001). Pharmacokinetics and clinical efficacy of pioglitazone. *Int J Clin Pract Suppl*, 19-25.
- Harris, S.G., and Phipps, R.P. (2001). The nuclear receptor PPAR gamma is expressed by mouse T lymphocytes and PPAR gamma agonists induce apoptosis. *Eur J Immunol* *31*, 1098-1105.
- Heath, W.R., Belz, G.T., Behrens, G.M., Smith, C.M., Forehan, S.P., Parish, I.A., Davey, G.M., Wilson, N.S., Carbone, F.R., and Villadangos, J.A. (2004). Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* *199*, 9-26.
- Heyninck, K., Wullaert, A., and Beyaert, R. (2003). Nuclear factor-kappa B plays a central role in tumour necrosis factor-mediated liver disease. *Biochem Pharmacol* *66*, 1409-1415.
- Hogquist, K.A., Jameson, S.C., Heath, W.R., Howard, J.L., Bevan, M.J., and Carbone, F.R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* *76*, 17-27.
- Holt, M.P., and Ju, C. (2006). Mechanisms of drug-induced liver injury. *Aaps J* *8*, E48-54.
- Hu, E., Kim, J.B., Sarraf, P., and Spiegelman, B.M. (1996). Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science* *274*, 2100-2103.
- Huang, J.T., Welch, J.S., Ricote, M., Binder, C.J., Willson, T.M., Kelly, C., Witztum, J.L., Funk, C.D., Conrad, D., and Glass, C.K. (1999). Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* *400*, 378-382.
- Hulin, B. (1994). New hypoglycaemic agents. *Prog Med Chem* *31*, 1-58.
- Ikeda, T. (2010). Drug-Induced Idiosyncratic Hepatotoxicity -Prevention Strategy Developed after the Troglitazone Case. *Drug Metab Pharmacokinet*.
- Issemann, I., and Green, S. (1990). Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* *347*, 645-650.

- Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelletier, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* 126, 1121-1133.
- Janeway, C.A., Jr., and Bottomly, K. (1994). Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell* 76, 275-285.
- Janeway, C.A., Jr., and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216.
- Jiang, C., Ting, A.T., and Seed, B. (1998). PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391, 82-86.
- Kaplowitz, N. (2001). Drug-induced liver disorders: implications for drug development and regulation. *Drug Saf* 24, 483-490.
- Kern, M., Popov, A., Scholz, K., Schumak, B., Djandji, D., Limmer, A., Eggle, D., Sacher, T., Zawatzky, R., Holtappels, R., *et al.* (2010). Virally infected mouse liver endothelial cells trigger CD8⁺ T-cell immunity. *Gastroenterology* 138, 336-346.
- Kim, S.R., Lee, K.S., Park, H.S., Park, S.J., Min, K.H., Jin, S.M., and Lee, Y.C. (2005). Involvement of IL-10 in peroxisome proliferator-activated receptor γ -mediated anti-inflammatory response in asthma. *Mol Pharmacol* 68, 1568-1575.
- Kita, H., Imawari, M., and Gershwin, M.E. (2004). Cellular immune response in primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res* 28, 12-17.
- Kliwer, S.A., Lenhard, J.M., Willson, T.M., Patel, I., Morris, D.C., and Lehmann, J.M. (1995). A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor γ and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83, 813-819.
- Kliwer, S.A., Umesono, K., Noonan, D.J., Heyman, R.A., and Evans, R.M. (1992). Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 358, 771-774.
- Klotz, L., Burgdorf, S., Dani, I., Saijo, K., Flossdorf, J., Hucke, S., Alferink, J., Nowak, N., Beyer, M., Mayer, G., *et al.* (2009a). The nuclear receptor PPAR γ selectively inhibits Th17 differentiation in a T cell-intrinsic fashion and suppresses CNS autoimmunity. *J Exp Med* 206, 2079-2089.
- Klotz, L., Dani, I., Edenhofer, F., Nolden, L., Evert, B., Paul, B., Kolanus, W., Klockgether, T., Knolle, P., and Diehl, L. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor γ control of dendritic cell function contributes to development of CD4⁺ T cell anergy. *J Immunol* 178, 2122-2131.
- Klotz, L., Hucke, S., Thimm, D., Classen, S., Gaarz, A., Schultze, J., Edenhofer, F., Kurts, C., Klockgether, T., Limmer, A., *et al.* (2009b). Increased antigen cross-presentation but impaired cross-priming after activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ is mediated by up-regulation of B7H1. *J Immunol* 183, 129-136.
- 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.
- Knolle, P.A., Schmitt, E., Jin, S., Germann, T., Duchmann, R., Hegenbarth, S., Gerken, G., and Lohse, A.W. (1999). Induction of cytokine production in naive CD4(+) T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells. *Gastroenterology* 116, 1428-1440.
- Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K., and Iwakura, Y. (2006). IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 177, 566-573.
- Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jager, A., Strom, T.B., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2007). IL21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 448, 484-487.
- Krey, G., Keller, H., Mahfoudi, A., Medin, J., Ozato, K., Dreyer, C., and Wahli, W. (1993). Xenopus peroxisome proliferator activated receptors: genomic organization, response element recognition, heterodimer formation with retinoid X receptor and activation by fatty acids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 47, 65-73.
- Kunzle, G., Hentze, H., Germann, P.G., Tiegs, G., Meergans, T., and Wendel, A. (1999). Concanavalin A hepatotoxicity in mice: tumor necrosis factor-mediated organ failure independent of caspase-3-like protease activation. *Hepatology* 30, 1241-1251.
- Lafdil, F., Wang, H., Park, O., Zhang, W., Moritoki, Y., Yin, S., Fu, X.Y., Gershwin, M.E., Lian, Z.X., and Gao, B. (2009). Myeloid STAT3 inhibits T cell-mediated hepatitis by regulating T helper 1 cytokine and interleukin-17 production. *Gastroenterology* 137, 2125-2135 e2121-2122.
- Lai, C.L., Ratziu, V., Yuen, M.F., and Poynard, T. (2003). Viral hepatitis B. *Lancet* 362, 2089-2094.
- Lehmann, J.M., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Wilkison, W.O., Willson, T.M., and Kliewer, S.A. (1995). An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 270, 12953-12956.
- Leist, M., Gantner, F., Bohlinger, I., Tiegs, G., Germann, P.G., and Wendel, A. (1995). Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models. *Am J Pathol* 146, 1220-1234.
- Lemberger, T., Desvergne, B., and Wahli, W. (1996). Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 335-363.
- Limmer, A., Ohl, J., Kurts, C., Ljunggren, H.G., Reiss, Y., Groettrup, M., Momburg, F., Arnold, B., and Knolle, P.A. (2000). Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* 6, 1348-1354.
- Limmer, A., Sacher, T., Alferink, J., Kretschmar, M., Schonrich, G., Nichterlein, T., Arnold, B., and Hammerling, G.J. (1998a). Failure to induce organ-specific autoimmunity by breaking of tolerance: importance of the microenvironment. *Eur J Immunol* 28, 2395-2406.

- Limmer, A., Sacher, T., Alferink, J., Nichterlein, T., Arnold, B., and Hammerling, G.J. (1998b). A two-step model for the induction of organ-specific autoimmunity. *Novartis Found Symp* 215, 159-167; discussion 167-171, 186-190.
- Lu, M., Kwan, T., Yu, C., Chen, F., Freedman, B., Schafer, J.M., Lee, E.J., Jameson, J.L., Jordan, V.C., and Cryns, V.L. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists promote TRAIL-induced apoptosis by reducing survivin levels via cyclin D3 repression and cell cycle arrest. *J Biol Chem* 280, 6742-6751.
- Lubberts, E. (2003). The role of IL-17 and family members in the pathogenesis of arthritis. *Curr Opin Investig Drugs* 4, 572-577.
- 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.
- Magnusson, S., and Berg, T. (1989). Extremely rapid endocytosis mediated by the mannose receptor of sinusoidal endothelial rat liver cells. *Biochem J* 257, 651-656.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., and Evans, R.M. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839.
- Mannel, D.N., Moore, R.N., and Mergenhagen, S.E. (1980). Macrophages as a source of tumoricidal activity (tumor-necrotizing factor). *Infect Immun* 30, 523-530.
- Manns, M.P., and Strassburg, C.P. (2001). Autoimmune hepatitis: clinical challenges. *Gastroenterology* 120, 1502-1517.
- Marx, N., Schonbeck, U., Lazar, M.A., Libby, P., and Plutzky, J. (1998). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 83, 1097-1103.
- Mathison, J.C., and Ulevitch, R.J. (1979). The clearance, tissue distribution, and cellular localization of intravenously injected lipopolysaccharide in rabbits. *J Immunol* 123, 2133-2143.
- Mellman, I., Turley, S.J., and Steinman, R.M. (1998). Antigen processing for amateurs and professionals. *Trends Cell Biol* 8, 231-237.
- Nagata, T., McKinley, L., Peschon, J.J., Alcorn, J.F., Aujla, S.J., and Kolls, J.K. (2008). Requirement of IL-17RA in Con A induced hepatitis and negative regulation of IL-17 production in mouse T cells. *J Immunol* 181, 7473-7479.
- Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J.G., Chen, H., and Evans, R.M. (1998). Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* 93, 229-240.
- Neuschwander-Tetri, B.A., Isley, W.L., Oki, J.C., Ramrakhiani, S., Quiason, S.G., Phillips, N.J., and Brunt, E.M. (1998). Troglitazone-induced hepatic failure leading to liver transplantation. A case report. *Ann Intern Med* 129, 38-41.
- Poynard, T., Yuen, M.F., Ratziu, V., and Lai, C.L. (2003). Viral hepatitis C. *Lancet* 362, 2095-2100.

- Ricote, M., and Glass, C.K. (2007). PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta* 1771, 926-935.
- Ricote, M., Li, A.C., Willson, T.M., Kelly, C.J., and Glass, C.K. (1998). The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391, 79-82.
- Rieder, H., Ramadori, G., Allmann, K.H., and Meyer zum Buschenfelde, K.H. (1990). Prostanoid release of cultured liver sinusoidal endothelial cells in response to endotoxin and tumor necrosis factor. Comparison with umbilical vein endothelial cells. *J Hepatol* 11, 359-366.
- Robin, M.A., Le Roy, M., Descatoire, V., and Pessayre, D. (1997). Plasma membrane cytochromes P450 as neoantigens and autoimmune targets in drug-induced hepatitis. *J Hepatol* 26 Suppl 1, 23-30.
- Robin, M.A., Maratrat, M., Le Roy, M., Le Breton, F.P., Bonierbale, E., Dansette, P., Ballet, F., Mansuy, D., and Pessayre, D. (1996). Antigenic targets in tienilic acid hepatitis. Both cytochrome P450 2C11 and 2C11-tienilic acid adducts are transported to the plasma membrane of rat hepatocytes and recognized by human sera. *J Clin Invest* 98, 1471-1480.
- Schonrich, G., Kalinke, U., Momburg, F., Malissen, M., Schmitt-Verhulst, A.M., Malissen, B., Hammerling, G.J., and Arnold, B. (1991). Down-regulation of T cell receptors on self-reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction. *Cell* 65, 293-304.
- Schopfer, F.J., Lin, Y., Baker, P.R., Cui, T., Garcia-Barrio, M., Zhang, J., Chen, K., Chen, Y.E., and Freeman, B.A. (2005). Nitrolinoleic acid: an endogenous peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2340-2345.
- Schumann, J., and Tiegs, G. (1999). Pathophysiological mechanisms of TNF during intoxication with natural or man-made toxins. *Toxicology* 138, 103-126.
- Schurich, A., Berg, M., Stabenow, D., Bottcher, J., Kern, M., Schild, H.J., Kurts, C., Schuette, V., Burgdorf, S., Diehl, L., *et al.* (2010). Dynamic regulation of CD8 T cell tolerance induction by liver sinusoidal endothelial cells. *J Immunol* 184, 4107-4114.
- Schurich, A., Bottcher, J.P., Burgdorf, S., Penzler, P., Hegenbarth, S., Kern, M., Dolf, A., Endl, E., Schultze, J., Wiertz, E., *et al.* (2009). Distinct kinetics and dynamics of cross-presentation in liver sinusoidal endothelial cells compared to dendritic cells. *Hepatology* 50, 909-919.
- Schwartz, R.H. (1996). Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J Exp Med* 184, 1-8.
- Schwartz, R.H. (1997). T cell clonal anergy. *Curr Opin Immunol* 9, 351-357.
- Steinman, R.M., Pack, M., and Inaba, K. (1997). Dendritic cell development and maturation. *Adv Exp Med Biol* 417, 1-6.
- Straus, D.S., Pascual, G., Li, M., Welch, J.S., Ricote, M., Hsiang, C.H., Sengchanthalangsy, L.L., Ghosh, G., and Glass, C.K. (2000). 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4844-4849.
- Streetz, K., Fregien, B., Plumpe, J., Korber, K., Kubicka, S., Sass, G., Bischoff, S.C., Manns, M.P., Tiegs, G., and Trautwein, C. (2001). Dissection of the intracellular pathways in hepatocytes

- suggests a role for Jun kinase and IFN regulatory factor-1 in Con A-induced liver failure. *J Immunol* *167*, 514-523.
- Streetz, K., Leifeld, L., Grundmann, D., Ramakers, J., Eckert, K., Spengler, U., Brenner, D., Manns, M., and Trautwein, C. (2000). Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of human and murine fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* *119*, 446-460.
- Szatmari, I., Rajnavolgyi, E., and Nagy, L. (2006). PPARgamma, a lipid-activated transcription factor as a regulator of dendritic cell function. *Ann N Y Acad Sci* *1088*, 207-218.
- Tiegs, G., Hentschel, J., and Wendel, A. (1992). A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J Clin Invest* *90*, 196-203.
- Tiegs, G., Wolter, M., and Wendel, A. (1989). Tumor necrosis factor is a terminal mediator in galactosamine/endotoxin-induced hepatitis in mice. *Biochem Pharmacol* *38*, 627-631.
- Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R.A., Budavari, A.I., and Spiegelman, B.M. (1994). mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* *8*, 1224-1234.
- Tontonoz, P., and Spiegelman, B.M. (2008). Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem* *77*, 289-312.
- Trinchieri, G., Pflanz, S., and Kastelein, R.A. (2003). The IL12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* *19*, 641-644.
- Tugwood, J.D., Issemann, I., Anderson, R.G., Bundell, K.R., McPheat, W.L., and Green, S. (1992). The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *Embo J* *11*, 433-439.
- Tyan, M.L. (1974). In vivo toxicity of concanavalin A. *Proc Soc Exp Biol Med* *146*, 1163-1165.
- van Rooijen, N., Bakker, J., and Sanders, A. (1997). Transient suppression of macrophage functions by liposome-encapsulated drugs. *Trends Biotechnol* *15*, 178-185.
- Van Rooijen, N., and Sanders, A. (1994). Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods* *174*, 83-93.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* *10*, 45-65.
- Wang, P., Anderson, P.O., Chen, S., Paulsson, K.M., Sjogren, H.O., and Li, S. (2001). Inhibition of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB in CD4 T cells by peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands. *Int Immunopharmacol* *1*, 803-812.
- Watkins, P.B., and Whitcomb, R.W. (1998). Hepatic dysfunction associated with troglitazone. *N Engl J Med* *338*, 916-917.
- Welch, J.S., Ricote, M., Akiyama, T.E., Gonzalez, F.J., and Glass, C.K. (2003). PPARgamma and PPARdelta negatively regulate specific subsets of lipopolysaccharide and IFN-gamma target genes in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 6712-6717.

- Willson, T.M., Lambert, M.H., and Kliewer, S.A. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease. *Annu Rev Biochem* 70, 341-367.
- 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.
- Xu, H.E., Lambert, M.H., Montana, V.G., Parks, D.J., Blanchard, S.G., Brown, P.J., Sternbach, D.D., Lehmann, J.M., Wisely, G.B., Willson, T.M., *et al.* (1999). Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell* 3, 397-403.
- Yang, X.O., Pappu, B.P., Nurieva, R., Akimzhanov, A., Kang, H.S., Chung, Y., Ma, L., Shah, B., Panopoulos, A.D., Schluns, K.S., *et al.* (2008). T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* 28, 29-39.
- Yu, K., Bayona, W., Kallen, C.B., Harding, H.P., Ravera, C.P., McMahon, G., Brown, M., and Lazar, M.A. (1995). Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J Biol Chem* 270, 23975-23983.
- Zenewicz, L.A., Yancopoulos, G.D., Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Karow, M., and Flavell, R.A. (2007). Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity* 27, 647-659.
- Zhu, Y., Qi, C., Calandra, C., Rao, M.S., and Reddy, J.K. (1996). Cloning and identification of mouse steroid receptor coactivator-1 (mSRC-1), as a coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Gene Expr* 6, 185-195.
- Zhu, Y., Qi, C., Jain, S., Rao, M.S., and Reddy, J.K. (1997). Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem* 272, 25500-25506.

VII. Abbildungsverzeichnis

I. Einleitung

Abb. I.1 Schematische Darstellung eines Lebersinusoiden im Längsschnitt	2
Abb. I.2 Schematische Darstellung der TNF vermittelten Apoptose-Signalwege in Hepatozyten	5
Abb. I.3 Domänenstruktur und Kristallstruktur der Ligandenbindungsdomäne von PPAR γ	7
Abb. I.4 Vereinfachte Darstellung des Signaltransduktionsweges von TLR4	10
Abb. I.5 Regulation der Gentranskription durch PPAR γ	15
Abb. I.6 Strukturformeln ausgewählter endogener PPAR γ Liganden aus der Gruppe der Eicosanoide	16
Abb. I.7 Die chemischen Strukturen ausgewählter Thiazolidindione	17

IV. Ergebnisse

Abb. IV.1 PCR Analyse von PPAR γ in LSEC und Einfluß von Pio auf die TLR Liganden induzierte Stimulation der IL6 Expression in LSEC	46
Abb. IV.2 Einfluss der Pio vermittelten Aktivierung von PPAR γ auf die TLR induzierte Expression von Oberflächenmolekülen bei LSEC	48
Abb. IV.3 Einfluss von Pio auf die Kreuzpräsentation und Antigenaufnahme von LSEC	49
Abb. IV.4 Einfluss der PPAR γ Aktivierung in APC auf die initiale Aktivierung von CD8 T Zellen	51
Abb. IV.5 Proliferationsprofil von CD8 T Zellen nach Kokultur mit PPAR γ aktivierten APC	52
Abb. IV.6 Die tolerogenen Eigenschaften von LSEC werden durch PPAR γ nicht beeinflusst	53
Abb. IV.7 Schematische Darstellung der Etablierung einer ConA vermittelten Hepatitis	55
Abb. IV.8 Einfluss der Aktivierung von PPAR γ auf die Entwicklung der ConA induzierten Hepatitis	56
Abb. IV.9 Schematische Darstellung des Cre/loxP Systems	57
Abb. IV.10 ConA vermittelte Hepatitis in T Zell spezifischen PPAR γ defizienten Mäusen	58
Abb. IV.11 PPAR γ inhibiert die Aktivierung von CD8 T Zellen in vitro	60
Abb. IV.12 Con A induzierte Zytokinexpression in Splenozyten	61
Abb. IV.13 Durchflusszytometrische Analyse PPAR γ aktivierter T Zellen	62
Abb. IV.14 Intrazelluläre Zytokinfärbung in T Zellen von PPAR γ Knockout und Wildtyp Mäusen	63
Abb. IV.15 Vereinfachte Darstellung der Induktion einer GalN/LPS-Hepatitis	64
Abb. IV.16 LPS-Titration in GalN sensitivierten C57BL/6 Mäusen	65
Abb. IV.17 Pioglitazon verstärkt den GalN/LPS induzierten Leberschaden	66
Abb. IV.18 Induktion der GalN/LPS Hepatitis in TNFR1 Knockout Mäusen	67
Abb. IV.19 LPS induzierte TNF-Produktion hepatischer Zellpopulationen	68
Abb. IV.20 Einfluss der PPAR γ Aktivierung auf Granulozyten	69
Abb. IV.21 GalN/LPS-Hepatitis in mit Pioglitazon-behandelten, Ly6G-depletierten C57BL/6 Mäusen	70
Abb. IV.22 Pioglitazon potenziert die Reaktivität von Kupffer Zellen	72
Abb. IV.23 Pioglitazon sensibilisiert Hepatozyten für TNF vermittelte Apoptose	73

V. Diskussion

Abb. V.1 Vereinfachte Übersicht über die Signaltransduktion des TNFR1 in Hepatozyten	79
--	----

VIII. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APC	antigen-präsentierende Zelle (<i>engl.</i> antigen presenting cell), Allophycocyanin
bidest.	bidestilliert
BM-DC	Knochenmark DC (<i>engl.</i> : bone marrow DC)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>engl.</i> : bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
c	komplementär (<i>engl.</i> complementary)
CD	Zelloberflächenmarker (<i>engl.</i> cluster of differentiation)
CFSE	Carboxyfluorescein di-amino Succinimidyl-Ester
Cmc	Carboxymethylzellulose
ConA	Concanavalin A
Cy5	Indodicarocyanin
DC	Dendritische Zelle (<i>engl.</i> : dendritic cell)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.</i> desoxyribonucleic acid)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>engl.</i> enzyme linked immunosorbent assay
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (<i>engl.</i> fluorescence activated cell sorting)
Fc	konstante Region eines Immunglobulins
FCS	Fötale Kälberserum (<i>engl.</i> : fetal calf serum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	<i>engl.</i> forward scatter
g	Gramm
GalN	D-Galaktosamin
GBSS	<i>engl.</i> Gey's Balanced Salt Solution
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein (<i>engl.</i> green fluorescent protein)

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
LSEC	<i>engl.</i> liver sinusoidal endothelial cells
M	Molar
m	milli, Meter
μ	mikro
MACS	Magnetische Zellsortierung (<i>engl.</i> magnetic activated cell sorter)
Min.	Minute
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>engl.</i> major histocompatibility complex)
n	nano
NK	Natürliche Killer-
OVA	Ovalbumin
Pio	Pioglitazon
Pam ₃ Cys	N-Palmitoyl-(S)-[2,3-Bis(palmitoyloxy)-(2-RS)-propyl]-[R]-cysteinyI-[S]-seryl-[S]-lysyl ₃ -lysine x 3HCl
PAMP	<i>engl.</i> pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>engl.</i> phosphate buffered saline)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PolyIC	<i>engl.</i> poly-inosinic acid-cytidylic acid
PRR	<i>engl.</i> pattern-recognition receptors
RNA	Ribonukleinsäure
Rag	<i>engl.</i> recombination activating gene
RT	Raumtemperatur
Sek.	Sekunde
SD	Standardabweichung (<i>engl.</i> standard deviation)
SSC	<i>engl.</i> sideward scatter
Std.	Stunde

TCR	T Zell-Rezeptor (<i>engl.</i> T cell receptor)
TLR	<i>engl.</i> Toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Unit(s), Umdrehungen
v/v	Verhältnis Volumen zu Volumen (<i>engl.</i> volume to volume)
w/v	Verhältnis Masse zu Volumen (<i>engl.</i> weight to volume)
WT	wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Auszüge dieser Arbeit waren Bestandteil folgender Publikation und Kongressbeiträge:

Publikation

Rike Schulte, Dirk Stabenow, Christina Metzger, Annette Erhardt, Gisa Tiegs, Nico van Rooijen, Christian Kurts, Karin Cederbrant, Luisa Klotz, Percy Knolle, Linda Diehl

“Pioglitazone-induced peroxisome proliferator-activated receptor γ activation influences hepatic immune regulation and aggravates murine immune-mediated hepatitis”

Zur Publikation eingereicht

Wissenschaftliche Konferenzen

- | | |
|------|--|
| 2009 | Vortrag und Posterpräsentation auf dem „2nd European Congress of Immunology (ECI)“ in Berlin

Titel: „Function of the peroxisome proliferator-activated receptor γ in Concanavalin A induced liver injury“ |
| 2010 | Posterpräsentation auf der „ Monothematic Conference: Signaling in the liver of the European Association for study of the liver (EASL)“ in Amsterdam

Titel: „Function of the peroxisome proliferator-activated receptor γ in experimental liver disease“ |
| 2010 | Posterpräsentation auf der „40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie“ in Leipzig

Titel: „Decreased cross-presentation as well as TLR mediated stimulation after activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ in sinusoidal endothelial cells“ |