

Rolle der Todesrezeptoren in immunvermittelten Lebererkrankungen

Dissertationsschrift zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)**

im Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Raluca Milena Wroblewski
geb. Oancea

aus Ploiești, Rumänien

Hamburg, 2015

Gutachter:

1. PD Dr. rer. nat. Johannes Herkel

I. Medizinische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

2. Prof. Dr. rer. nat. Julia Kehr

Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg

Tag der Disputation: 16.10.2015

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	3
1.1	Das Immunsystem	3
1.1.1	Die angeborene Immunantwort.....	3
1.1.2	Die adaptive Immunantwort	4
1.2	Leber und Lebererkrankungen	6
1.3	Todesrezeptoren und Todesliganden.....	7
1.4	TNF/TNFR1 in immunvermittelten Erkrankungen.....	10
1.5	Verwendete Modelle immunmediierter Lebererkrankungen.....	11
1.5.1	Das Concanavalin A Modell der experimentellen Hepatitis.....	11
1.5.2	Das LPS/Gal Modell des akuten Leberschadens.....	13
1.5.3	Das LPS Modell des septischen Schocks.....	14
1.6	Konditioneller Knock-Out mit Hilfe des Cre/LoxP Systems	14
1.7	Zielsetzung.....	16
2	Materialien und Methoden	18
2.1	Materialien	18
2.1.1	Laborgeräte	18
2.1.2	Glas- und Kunststoffverbrauchsmaterialien.....	18
2.1.3	Chemikalien	19
2.1.4	Antikörper und Farbstoffe.....	19
2.1.5	Kits	20
2.1.6	Primer	20
2.1.7	Chemikalien für in vivo Studien.....	21
2.1.8	Puffer und Lösungen.....	21
2.1.9	Agentien	22
2.1.10	Versuchstiere.....	23
2.1.11	Software und Datenbanken	23
2.2	Methoden.....	24
2.2.1	in vivo Studien	24
2.2.2	Genotypisierung	25
2.2.3	Organpräparation	26
2.2.4	Bestimmung der Alanin-Aminotransferase aus dem Serum	27
2.2.5	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	27
2.2.6	Untersuchungen auf histologischer Ebene	28
2.2.7	Hämatologische Analyse	32
2.2.8	Durchflusszytometrie	32
2.2.9	Zellzahlbestimmung	35
2.2.10	Untersuchungen auf RNA Ebene	36
3	Ergebnisse.....	39
3.1	Die Rolle von Todesrezeptoren im Concanavalin A Modell der experimentellen Hepatitis	39
3.1.1	Leberparenchym-spezifisches FADD ist entbehrlich in der ConA-vermittelten Leberentzündung	39
3.1.2	Generierung und Charakterisierung der TNFR1 ^{LPC-KO} Tiere	42
3.1.3	Leberparenchym spezifischer TNFR1 ist im ConA Modell der Leberentzündung entbehrlich	44
3.1.4	3DR ^{LPC-KO} Tiere sind nicht vor ConA-induzierten Leberentzündung geschützt.....	47
3.1.5	Generierung und Charakterisierung der TNFR1 ^{TC-KO} Linie	48

3.1.6 TNFR1 ^{TC-KO} Tiere sind nicht vor ConA-induziertem Schaden geschützt.....	50
3.1.7 Generierung und Charakterisierung der TNFR1 ^{EC-KO} Tiere.....	52
3.1.8 TNFR1 ^{EC-KO} Tiere sind im ConA Modell nicht vor Leberschaden geschützt	54
3.1.9 Generierung und Charakterisierung der TNFR1 ^{MDC-KO} Linie.....	57
3.1.10 MDC-residenter TNFR1 ist essentiell für die Leberschädigung im ConA Modell	59
3.1.11 Mechanistische Untersuchungen der TNFR1 ^{MDC-KO} Gruppe im ConA Modell bei zusätzlicher Behandlung mit Galactosamin	70
3.1.12 Mechanistische Untersuchungen der TNFR1 ^{MDC-KO} Tiere mittels Blockade des IL-10- Rezeptors.....	72
3.2 Die Rolle von TNFR1 im LPS/Gal Modell des akuten Leberversagens.....	73
3.2.2 T-Zell-spezifischer TNFR1 ist entbehrlich im LPS/Gal Modell des akuten Leberversagens..	75
3.2.3 Endothelzell-spezifischer TNFR1 ist entbehrlich im LPS/Gal Modell des akuten Leberversagens.....	76
3.2.4 TNFR1 ^{MDC-KO} Tiere sind im LPS/Gal Modell nicht vor akutem Leberversagen geschützt.....	77
3.3 Die Bedeutung von TNFR1 im LPS Modell des septischen Schocks	77
3.3.1 TNFR1 ^{LPC-KO} haben im LPS Modell keinen Überlebensvorteil	78
3.3.2 TNFR1 ^{TC-KO} haben im LPS Modell keinen Überlebensvorteil	78
3.3.3 TNFR1 ^{EC-KO} haben im LPS Modell keinen Überlebensvorteil	79
3.3.4 TNFR1 ^{MDC-KO} haben im LPS Modell keinen Überlebensvorteil.....	80
4 Diskussion.....	81
4.1 Leberparenchym-spezifischer TNFR1 mediert den Leberschaden im LPS/Gal aber nicht im Concanavalin A Modell.....	81
4.2 T-Zell- und Endothelzell-residenter TNFR1 ist entbehrlich für die Entstehung des Leberschadens in den untersuchten Modellen der experimentellen Hepatitis	84
4.3 TNFR1 auf MDCs vermittelt die Entstehung des Leberschadens im Concanavalin A Modell während es im LPS/Gal und im LPS Modell nicht von Bedeutung ist	86
4.4 Ausblick.....	92
5 Zusammenfassung.....	94
6 Abstract	96
7 Literaturverzeichnis	98
Abkürzungsverzeichnis	108
Danksagung	111
Publikation.....	112
Eidesstattliche Versicherung	113

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem reguliert die Abwehr eines gesunden Organismus, in dem es nicht nur bestehende Infektionen beseitigt, sondern auch vor Neuen schützt¹. Diese Aufgabe wird von einer Vielzahl an Zellen übernommen, die im gesamten Organismus verteilt sind und kann nur durch deren stete Dynamik und komplexe Wechselwirkungen, sowohl miteinander, als auch mit anderen Organsystemen gewährleistet werden².

Die stetige Konfrontation des Organismus mit Umwelttoxinen, Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten erfordert eine schnelle und effiziente Reaktion des Immunsystems, die auf zwei miteinander interagierenden Ebenen stattfindet: die angeborene und die adaptive Immunität¹.

1.1.1 Die angeborene Immunantwort

Die angeborene Immunantwort ist die erste Verteidigungslinie gegen Erreger und besteht sowohl aus einer anatomischen Epithelbarriere, als auch aus verschiedenen Zellen, die schnell und unspezifisch gegen verschiedene Pathogene reagieren³. Zu der angeborenen Immunität werden die natürlichen Killerzellen, Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen und das Komplementsystem gezählt^{4,5}. Pathogene werden von den Zellen der angeborenen Immunantwort schnell erkannt und beseitigt, obwohl sie für den Organismus unbekannt sind. Dies beruht auf der Fähigkeit dieser Zellen sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP, pathogen associated molecular pattern) zu erkennen, die eine schnelle Unterscheidung zwischen „fremd“ und „selbst“ ermöglichen⁶⁻⁸.

PAMPs sind im Laufe der Evolution konservierte Strukturen, wie zum Beispiel Mannose-reiche Oligosaccharide oder Lipopolysaccharide und werden von PRRs (pattern recognition receptors) erkannt, die auf den Zellen der adaptiven Immunantwort exprimiert werden. Sie werden in mehreren Kategorien unterteilt und kommen entweder frei im Serum wie das Mannose-bindende Lektin oder membrangebunden wie die Toll-like Rezeptoren (TLRs) vor^{4,6,9}.

Während der angeborenen Immunantwort werden Zytokine sezerniert, die wichtige lokale Effekte bei der Beseitigung der Erreger haben. So induzieren sie zum Beispiel eine Entzündung oder agieren als Botenstoff bei der Aktivierung anderer Zellen⁶.

1.1.2 Die adaptive Immunantwort

Wird ein Erreger nicht allein durch die angeborene Immunantwort abgewehrt, gelangen Antigene oder Antigen-präsentierende Zellen in die sekundären lymphatischen Organe und aktivieren durch die zusätzliche Expression von kostimulatorischen Molekülen die adaptive Immunantwort. Diese späte Antwort wird ihrerseits in die humorale und die zelluläre Immunität unterteilt und kennzeichnet sich durch eine sehr hohe Diversität und Spezifität. Zusätzlich entwickeln die Zellen der adaptiven Immunantwort im Gegensatz zu denen der angeborenen Immunität ein immunologisches Gedächtnis. Dieses Gedächtnis ermöglicht bei erneuter Infektion mit dem gleichen Erreger eine schnellere und gezieltere Antwort des Immunsystems¹⁰.

Zu der zellulären adaptiven Immunantwort werden die B- und T-Lymphozyten gezählt. Beide Arten von Lymphozyten werden im Knochenmark produziert und zirkulieren nach ihrer Reifung als naive Lymphozyten mit dem Blutstrom durch die lymphatischen Organe, wo sie auf ihre Aktivierung durch das angeborene Immunsystem warten¹¹.

Lymphozyten werden aufgrund ihrer exprimierten Oberflächenmoleküle unterschieden, die ebenfalls als Differenzierungsmarker oder „cluster of differentiation“ (CD) bezeichnet werden^{2,1}.

Die B-Lymphozyten (B-Zellen) reifen beim Menschen im Knochenmark, ihren Namen erhielten sie jedoch von der Bursa fabricius, dem lymphatischen Organ in dem sie sich bei Vögeln entwickeln. Bindet ein Antigen an auf der Oberfläche exprimierte B-Zell-Antigen-Rezeptoren (BCR), proliferieren die B-Lymphozyten und differenzieren zu Plasma-Zellen. In diesem Effektor-Stadium produzieren die B-Lymphozyten Antikörper, Immunglobuline, die die sezernierte Form des BCR darstellen. Die Antikörper, die der humoralen adaptiven Immunantwort angehören, erkennen und binden hoch affin und sehr spezifisch Antigene^{6,12,13}.

T-Lymphozyten (T-Zellen) reifen im Thymus und werden in zwei große Gruppen unterteilt: die CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen, die infizierte Zellen töten und die CD4⁺ T-Helferzellen, die erneut in verschiedenen Kategorien unterteilt werden und die Immunantwort regulieren und optimieren. T-Zellen erkennen fremde Antigene nur, wenn diese auf der Oberfläche körpereigener Zellen zusammen mit MHC-Proteinen exprimiert werden. Diese körpereigenen Proteine werden aufgrund der großen Rolle, die sie bei der Transplantatabstoßung spielen, MHC-Proteine (major histocompatibility complex) genannt^{1,14}.

Zum Zweck der Antigenerkennung besitzen T-Lymphozyten auf ihrer Oberfläche T-Zell-Antigen-Rezeptoren (TCR), die strukturell Antikörper-Fragmenten ähneln. Die TCRs bestehen aus zwei in der Zellmembran verankerten Ketten, an die extrazelluläre Domänen binden, die aus konstanten und

variablen Regionen bestehen. Durch somatische Rekombinationen und Insertionen kann eine sehr hohe Diversität der TCR gewährleistet werden, wodurch sehr viele Antigene erkannt werden können⁶.

Um eine T-Zelle zu aktivieren, wird neben der Bindung an das erkannte präsentierte Antigen obligat ein zweites kostimulatorisches Signal derselben antigenpräsentierenden Zelle benötigt. Dies erfolgt durch die Bindung weiterer kostimulatorischer Moleküle zwischen den beiden Zellen. Erst dann kann die T-Zell-Proliferation und die Zytokinproduktion beginnen^{2,15}.

Erst das komplexe Zusammenspiel beider Ebenen der Immunabwehr, der schnellen aber unspezifischen angeborenen Immunität und der sehr diversen aber etwas langsameren adaptiven Immunantwort, ermöglicht die Abwehr schädlicher Pathogene. Die Wichtigkeit der reibungslosen und gleichzeitig regulierten Funktionsweise des Immunsystems wird vor allem in Folge von Immundefizienz oder Autoimmunität vergegenwärtigt.

Um unnötige und schädliche Aktivierung des Immunsystems zu vermeiden, müssen die Zellen zwischen „eigen“ und „fremd“ unterscheiden können¹⁶. Potentiell auto-reaktive Lymphozyten werden normalerweise während der Entwicklung eliminiert^{13,17}. Da die Erkennung auto-reaktiver Lymphozyten indirekt stattfindet können manche dieser Zellen der Eliminierung entgehen und können heranreifen.

Manche Lymphozyten zeigen zusätzlich zu der erwünschten Erkennung fremder Antigene ebenfalls eine schwache Auto-Reaktivität auf¹³. Um die generelle Immunantwort nicht zu schwächen werden solche Zellen nicht eliminiert^{6,18}.

Werden Autoantigene vom adaptiven Immunsystem erkannt und es erfolgt eine Immunantwort, spricht man von Autoimmunität. Die Autoimmunität ist das Ergebnis fehlerhafter Selbsttoleranz und kann zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen führen. Über die Ätiologie dieser Erkrankungen ist relativ wenig bekannt. Jedoch wird bei der Entwicklung dieser Erkrankungen, von denen Frauen häufiger betroffen sind als Männer, die wichtige Funktion genetischer Prädispositionen und die Bedeutung verschiedener Umweltfaktoren diskutiert⁶.

Autoimmunerkrankungen können entweder Organ-spezifisch wie zum Beispiel Diabetes mellitus Typ I und Multiple Sklerose oder systemisch, wie zum Beispiel Rheumatoide Arthritis sein^{6,19}. Die Schädigung der Organe und Gewebe erfolgt sowohl durch Antikörper als auch durch Effektor-T-Zellen^{6,20}. Da das Autoantigen im Gegensatz zu fremden Antigenen nicht einfach eliminiert werden kann, kann die Immunantwort nicht reguliert werden, sodass Autoimmunerkrankungen einen chronischen Status erreichen können^{6,21}.

1.2 Leber und Lebererkrankungen

Die Leber, die als zentrales Stoffwechselorgan viele lebenswichtige Funktionen erfüllt, spielt auch bei der Immunantwort eine wichtige Rolle. Zu ihren Funktionen zählen die Verwertung der Nahrung und die Entgiftung durch Abbau von Medikamenten und Stoffwechselprodukten. In der Leber werden außerdem Gerinnungsfaktoren synthetisiert, die Galle gebildet und Vitamine gespeichert^{22,23}.

Die Leber erfüllt eine Reihe an Aufgaben, aufgrund derer sie eine immunologische Sonderstellung einnimmt. Da sie an der Metabolisierung vieler Stoffe beteiligt ist, muss die Leber sowohl Antigene und Pathogene aus dem Blut eliminieren, als auch eine Toleranz gegenüber Nahrungsantigenen entwickeln. Die über die Pfortader aus dem Gastrointestinaltrakt in hohem Maße eindringenden Antigene würden eine zu häufige und schädliche Immunabwehr hervorrufen, die durch die Ausbildung einer peripheren Toleranz in der Leber verhindert wird^{24,25}.

In Folge einer Infektion werden unter anderem von Makrophagen verschiedene Zytokine wie TNF, IL-6 und IL-1 β ausgeschüttet, die in der Leber die Produktion der Akute-Phase-Proteine wie das C-reaktive-Protein oder das Mannose-bindende-Lektin induzieren, was zur Aktivierung des Komplement-Systems führt^{6,10,26}.

Im Verlauf vieler Erkrankungen der Leber wie zum Beispiel Virus-Hepatitis, autoimmune Hepatitis (AIH) oder die primäre sklerosierende Cholangitis (PSC) wurden unterschiedliche Funktionen des Immunsystems als kritische Faktoren beschrieben^{6,27,28}. In vielen Fällen wie zum Beispiel bei der chronischen Hepatitis ist die Aktivierung des Immunsystems, der damit verbundene Zelluntergang und die Wundheilungsreaktion der Leber ein wichtiger Aspekt der Pathogenese²⁹.

Schädliche Agentien, wie zum Beispiel Drogen, Medikamente und Alkohol, können zu einer Leberentzündung, einer Hepatitis, führen. Auch andere wichtige Faktoren, wie Viren und Autoimmunerkrankungen, können sowohl zu einer akuten Hepatitis als auch zu chronischen Lebererkrankungen führen. Bei einer akuten Hepatitis besteht das Risiko des Leberversagens während die Konsequenz einer chronischen Erkrankung die zunehmende Vernarbung (Fibrosierung) bis hin zum Stadium der weitestgehend irreversiblen Leberzirrhose sein kann. Der Funktionsverlust des Gewebes resultiert aus stetem Verlust und ständiger Regeneration der Hepatozyten durch persistierende Inflammation. Ebenfalls wird der Gewebeanteil der extrazellulären Matrix erhöht was zur irreversiblen Veränderungen der Leberarchitektur führen kann^{2,30}.

Durch ihre sehr wichtige Aufgabe und gleichzeitig durch die hohe Fähigkeit zur Regeneration nimmt die Leber eine Sonderstellung ein, die es ihr ermöglicht auch im Falle großer Leberschädigung die

lebensnotwendigen Funktionen aufrechtzuerhalten. Viele Erkrankungen werden somit nicht aufgrund fehlender oder fehlerhafter Leberfunktion sondern aufgrund vermehrter Leberschädigung bemerkt. Die Schädigung der Leber kann einerseits laborchemisch durch das Vorhandensein erhöhter hepatozellulärer Transaminasen im Serum und andererseits durch histologische Veränderungen, die in einer Biopsie sichtbar sind, erkannt werden³¹.

Alanin-Aminotransferase (ALT), eine der hepatozellulären Transaminasen, ist ein Enzym, das vor allem im Zytoplasma von Hepatozyten vorhanden ist und dort bei der Katalyse im Stoffwechsel gebraucht wird. Wenn Hepatozyten sterben oder geschädigt werden, wird die ALT freigesetzt. Eine Messung erhöhter ALT-Werte im Blutplasma deutet somit auf vermehrtes Sterben der Hepatozyten, also auf Leberschädigung hin³².

1.3 Todesrezeptoren und Todesliganden

Apoptose oder programmierter Zelltod ist ein entscheidender Prozess in der Entwicklung und Homöostase eines Organismus³³. Durch Apoptose werden unerwünschte Zellen sowohl während der Embryonalentwicklung eliminiert als auch im adulten Organismus unter anderem nach erfolgter Immunabwehr. Eine unkontrolliert erfolgte Apoptose wird in Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson beobachtet, während nicht stattfindender programmierter Zelltod zu Krebs führen kann³⁴. Die Entdeckung der Todesrezeptoren und deren Funktion zeigte, dass Apoptose nicht nur durch intrazelluläre Faktoren sondern auch durch externe Signale induziert werden kann³⁵. Die Todesrezeptoren gehören der TNF-Rezeptor-Superfamilie an. Strukturell gesehen gehören diese Oberflächenrezeptoren zu den Transmembranproteinen Typ I³⁶.

Die Todesrezeptoren helfen dabei, die Homöostase der Leber aufrecht zu erhalten, indem sie unerwünschte Zellen kontrolliert eliminieren. Mit der Bindung von sogenannten Todesliganden an die Todesrezeptoren wird der extrinsische Apoptose-Signalweg aktiviert³⁵. Sowohl in der menschlichen als auch in der murinen Leber sind verschiedene Todesrezeptoren bekannt. Am Zelltod in der Leber sind jedoch nur Fas, TNFR1 (Tumor-Nekrose-Faktor 1) und TRAILR1 (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1) beteiligt, wobei die menschliche Leber zusätzlich den TRAILR2 exprimiert^{37,38,36}.

Der prototypische Todesligand TNF (Tumor-Nekrose-Faktor) ist ein pleiotropisches Zytokin, das früher unter verschiedenen Namen wie TNF α oder Kachexin bekannt war und ursprünglich aufgrund seiner Fähigkeit, Nekrose von Tumorzellen zu induzieren, entdeckt wurde³⁹. TNF ist ein proinflammatorisches Zytokin, das nicht nur Apoptose und Entzündung mediiert sondern auch die Immunantwort reguliert.

TNF ist ein Homotrimer mit einer Länge von 157 Aminosäuren⁴⁰, das sowohl in sezernierter als auch in membrangebundener Form vorkommt⁴¹, und an zwei Rezeptoren, TNFR1 und TNFR2, binden kann. Beide Rezeptoren sind Transmembran-Glykoproteine vom Typ I, die aus einer N-terminalen extrazellulären Domäne, einer Transmembran-Domäne und einer C-terminalen intrazellulären Domäne bestehen. Während die extrazelluläre Domäne beider Rezeptoren vier Cystein-reiche konservierte Bereiche beinhaltet, sind die intrazellulären Domänen sehr unterschiedlich. Die intrazelluläre Domäne des TNFR1 weist einen Komplex, die sogenannte Todesdomäne (DD, death domain), auf. Diese Todesdomäne ist homolog zu denen der Todesrezeptoren Fas und TRAIL. Der TNFR2 besitzt keine Todesdomäne sondern eine Serin-reiche Region, die auch Ligand-unabhängig phosphorylieren kann^{39,42-44}.

Die TNF-TNFR1 Signalkaskade ist sehr komplex und kann sowohl zum Tod der Zellen als auch zur Proliferation und Regeneration führen. Die essentielle Funktion von TNF in verschiedenen biologischen Prozessen ist durch die Möglichkeit bedingt, sowohl pro- als auch antiapoptotische Signale zu vermitteln. Beide Signalwege interagieren auf mehreren Ebenen der Signalkaskaden miteinander. Die Aktivierung des einen Weges ist durch die Inaktivierung des anderen bedingt, was auf die Fähigkeit der Zellen hindeutet je nach Bedarf, die Signalkaskade zu dirigieren⁴⁵. Die Bindung von TNF an TNFR1 führt entweder zur Aktivierung des pro- oder antiapoptotischen Signalwegs. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B (nuclear factor kappa B) sowie die ihm vorgeschalteten Adaptern stellen in diesem Zusammenhang kritische anti-apoptotische, JNK (Jun-N-terminal kinase) und die durch (Pro-) Caspase 8-initiierte Kaskade hingegen wesentliche pro-apoptotische Wege dar^{46,47}. Die Ausbalancierung der pro- und anti-apoptotischen Signaltransduktion ist nur unvollständig verstanden, in vielen Kontexten erscheint jedoch der primäre Weg der antiapoptotische zu sein^{39,48}. Die TNF-TNFR1 Signalkaskade ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt⁴⁹.

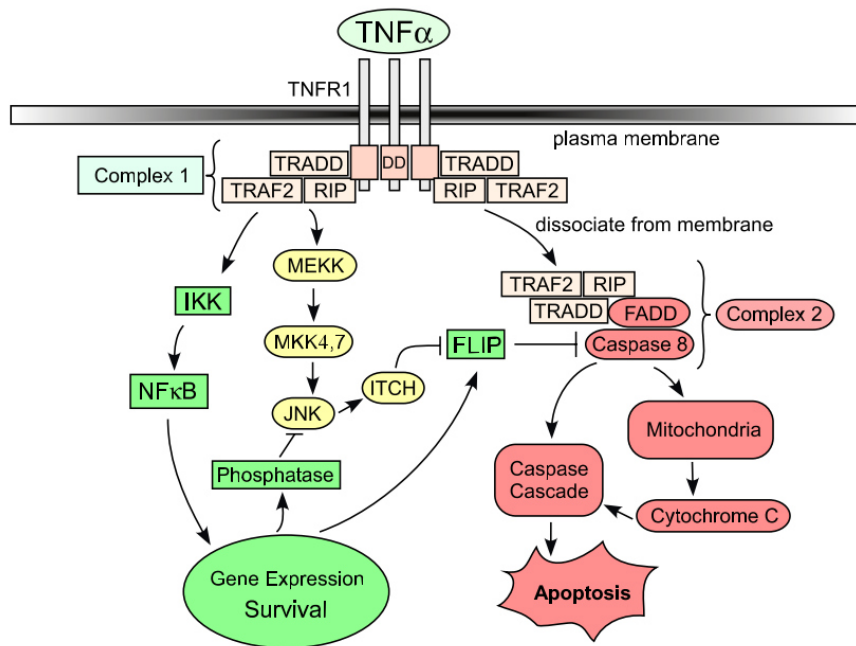


Abb. 1: Schematische Darstellung der TNF-TNFR1 Signalkaskade⁴⁹. Die Bindung von TNF an TNFR1 kann sowohl zur Apoptose (rot dargestellt) als auch zur Proliferation der Zellen (grün dargestellt) führen. Beide Signalwege interagieren auf mehreren Ebenen miteinander. Gelb dargestellt ist die Aktivierung der Kinase JNK.

In Folge einer TNF-TNFR1 Bindung erfolgt zunächst eine Konformationsänderung des Rezeptors, die die Rekrutierung von Adaptormolekülen ermöglicht⁵⁰. Das Adaptorprotein TRADD (TNF receptor-associated protein with death domain), das ebenfalls eine Todesdomäne besitzt, bindet an den intrazellulären Bereich des TNFR1 und dient als Gerüst für die Bindung weiterer Proteine wie TRAF-2 (TNF receptor-associated factor 2) und RIP1 (receptor-interacting protein 1). Dieser Komplex 1 besteht aus TRADD, TRAF-2 und RIP1 und aktiviert die IκB-Kinase. Diese Kinase degradiert IκB-Proteine, die normalerweise gebunden an NF-κB-Dimeren vorkommen und diese im Zytoplasma inaktivieren. In Folge der IκB-Protein-Degradation translozieren die nun freigesetzten NF-κB-Dimere in den Nukleus, wo sie spezifisch an DNA-Sequenzen binden und die Transkription der Zielgene und Expression von Proteinen wie c-FLIP (cellular FLICE inhibitory protein) ermöglichen (Abb. 1)^{45,49,51,52}.

Der Komplex bestehend aus TRADD, TRAF-2, RIP1 wird vom TNFR1 abgekoppelt, in das Zytoplasma internalisiert und bindet das Adaptorprotein FADD (Fas-associated with death domain), das für die Rekrutierung von Caspase-8 essentiell ist und die Todesrezeptoren-induzierte Apoptose ermöglicht^{43,53}. Fehlt der Adapter FADD im Kontext der NF-κB-Inhibition, so ist die Leber dramatisch vor Apoptose geschützt^{52,54}, Kondylis/Polykratis/Ehlfen et al., unpublished. Die Caspase-8 wird durch autokatalytische Spaltung aktiviert und spaltet ihrerseits Proteine, die zur Permeabilisierung der Mitochondrien und

zur Freisetzung von Cytochrom c führen. Durch Cytochrom c werden weitere molekulare Komplexe gebildet, die die Effektor-Caspase 3 aktivieren und somit die Apoptose induzieren (Abb. 1)⁵⁵.

Ebenfalls durch Bindung von TNF an den TNFR1 kann der JNK-Signalweg aktiviert werden⁵⁶. Die JNK-Aktivierung erfolgt diphasisch. Zunächst wird mit Hilfe der Adaptorproteine TRAF-2 und TRAF-5 die MAP Kinase Kinase Kinase TAK1 aktiviert, die ihrerseits die MAP Kinase Kinase MKK7 phosphoryliert und aktiviert, durch die JNK aktiviert wird⁵⁷. Später nach der TNF-TNFR1 Bindung erfolgt die zweite Phase der JNK-Aktivierung. Ein durch TNF induzierter Protein-Komplex, zu dem auch TRADD und RIP1 gehören, hat die Akkumulation von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) zur Folge, die schließlich zu JNK-Aktivierung führt. Diese Aktivierung kann durch NF- κ B supprimiert werden⁵⁸⁻⁶⁰. Die Rolle der JNK-Aktivierung für die Vermittlung von apoptotischen oder proliferativen Signalen wird kontrovers diskutiert, die beiden Phasen scheinen jedoch unterschiedliche Signalwege zu mediieren. Die initiale Phase der TRAF-medierte JNK-Aktivierung scheint dem Überleben der Zellen zu dienen, während die zweite Phase den ROS-bedingten Zelltod begünstigt^{61,62}.

1.4 TNF/TNFR1 in immunvermittelten Erkrankungen

Durch TNF initiierte Signalwege haben bei vielen Erkrankungen wie zum Beispiel Sepsis, bei der zerebralen Malaria, Diabetes oder bei Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis oder Multiple Sklerose eine kritische Funktion⁴⁰.

Bei vielen Lebererkrankungen des Menschen, wie zum Beispiel Virus-Hepatitis und Steatohepatitis, wurde die Wichtigkeit der Todesrezeptoren beschrieben⁶³. Für die Leber wurde außerdem gezeigt, dass das Adaptorprotein FADD sowohl Todesrezeptor-abhängige, als auch Todesrezeptor-unabhängige Signalwege, die zum Zelltod führen, vermittelt⁵². Die genaue Funktionsweise und Funktion von verschiedenen TNF-TNFR1 Signalwegen ist jedoch noch unklar. Die Tatsache, dass anti-TNF Therapien mit Fusionsproteinen wie Etanercept, die an TNF binden und dadurch die Bindung an den TNFR verhindern oder mit anti-TNF Antikörpern wie Adalimumab oder Infliximab Erfolge bei Patienten mit autoimmunen oder inflammatorischen Erkrankungen wie Morbus Crohn, Rheumatoider Arthritis, Psoriasis oder Colitis ulcerosa zeigen, unterstreicht die kritische Bedeutung der TNF-TNFR1 Signalwege^{64,65,66}. Zudem wurden AIH-Patienten, die auf die Standard-Therapie mit Azathioprin, einem Wirkstoff, der die Proliferation von B- und T-Zellen verhindert, nicht ansprechen, erfolgreich mit Infliximab behandelt⁶⁷.

Die systemische Inhibierung von TNF birgt jedoch ein erhöhtes Risiko für opportunistische Infektionen, sowohl für neuerworbene als auch für reaktivierte, wie zum Beispiel Tuberkulose^{68,69}.

Dieselben erhöhten Risiken einer Infektion und eine daraus resultierende erhöhte Mortalität bei Behandlung mit anti-TNF konnte auch im Falle der alkoholbedingten Hepatitis beobachtet werden^{70,71}.

Für die Entwicklung von gezielteren Therapien mit geringeren Nebenwirkungen ist die vollständige Aufklärung der TNF-TNFR1 Signalkaskade unabdingbar.

1.5 Verwendete Modelle immunmediierter Lebererkrankungen

Die komplexen Interaktionen der Zellen des Immunsystems, der Zytokine und Chemokine, der Parenchymzellen und der Signalkaskaden, die schließlich zu Leberschädigung führen, machen die Untersuchung im Mausmodell unabdingbar, da sich *in vitro* Experimente als unzureichend erwiesen, diese Komplexität darzustellen.

In dieser Arbeit wurden zur Untersuchung der Rolle von Todesrezeptoren in immunvermittelten Lebererkrankungen das Concanavalin A und das LPS/Gal Modell sowie das LPS Modell des septischen Schocks verwendet. In allen Modellen ist die TNF-TNFR1 Signalachse von zentraler Bedeutung. Während das Concanavalin A Modell der akuten Hepatitis ein T-Zell- abhängiges Modell ist^{72,73} und damit wesentlich Aspekte der Pathogenese der AIH widerspiegelt, wird der Leberschaden im LPS/Gal- und im LPS Modell T-Zell-unabhängig mediiert^{74,75}.

1.5.1 Das Concanavalin A Modell der experimentellen Hepatitis

Eines der meistverwendeten Mausmodelle zur Untersuchung des akuten Leberschadens ist das Concanavalin A (ConA) Modell der akuten experimentellen Hepatitis. Das Pflanzenlektin aus der Jackbohne (*Canavalia ensiformis*) wirkt *in vitro* mitogen auf T-Zellen und aktiviert diese unspezifisch⁷⁶. Die einmalige intravenöse Gabe von ConA führt in Mäusen zur Aktivierung des Immunsystems und zum Leberschaden. Bei dieser induzierten fulminanten Hepatitis wurde sowohl die Beteiligung von T-Zellen und NKT-Zellen, als auch von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten beschrieben^{72,73}.

Es konnte gezeigt werden, dass TNF eine kritische Bedeutung im ConA Modell zu schreiben ist: TNF^{-/-} Mäuse sind vor Leberschaden in diesem Modell geschützt. Auch TNFR1^{-/-} und TNFR2^{-/-} Mäuse weisen in Folge von ConA-Injektion keinen Leberschaden auf^{77,78}. Als Quelle der TNF-Produktion wurden sowohl die T-Zellen als auch Makrophagen beschrieben. Wenn die Sezernierung von TNF entweder von der einen oder von der anderen Zellpopulation blockiert wird, ist der Leberschaden in Folge der ConA-Behandlung deutlich reduziert⁷⁹.

Ein weiterer wichtiger Faktor in diesem Modell ist die Kinase JNK. Sowohl für die TNF-Sezernierung, als auch für die Induktion der Hepatitis wird die JNK-Expression in hämatopoetischen Zellen benötigt, da ein Knock-Out von JNK1/2 in diesen Zellpopulationen zu deutlich vermindertem Leberschaden führt⁶⁰.

Die Funktionsweise dieses Modells ist nicht vollständig aufgeklärt. Es wurde vorgeschlagen, dass in Folge der i.v. Injektion ConA in die Leber gelangt und dort Endothel-Zellen (LSECs, liver sinusoidal endothelial cells) sowie T-Zellen und Makrophagen aktiviert. In Folge dessen produzieren T-Lymphozyten und Makrophagen Zytokine wie zum Beispiel IFN γ und TNF. Die aktivierten Zellen und die Zytokine gelangen in das Leberparenchym, wo es zu Leberschädigung und zum Tod der Parenchymzellen kommt. Ein attraktives Konzept dieses Aspekts der Pathogenese erscheint daher, dass TNF aus Zellen des Immunsystems ausgeschüttet wird und den Leberschaden durch die Einwirkung direkt auf die Parenchymzellen generiert^{45,77,80,81}.

In Abbildung 2 ist die vorgeschlagene Funktionsweise des ConA Modells schematisch dargestellt.

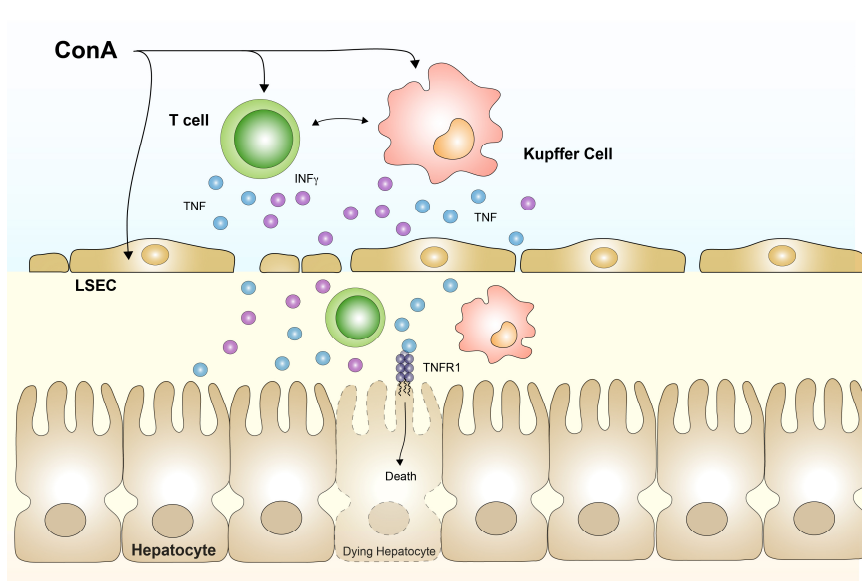


Abb. 2: Schematische Darstellung der vorgeschlagenen Funktionsweise des ConA Modells. ConA gelangt in Folge der Injektion in die Leber, aktiviert LSECs, T-Zellen (grün) und Kupfer Zellen (rosa). Die aktivierten T- und Kupfer Zellen produzieren TNF (blau) und IFN γ (violett). Die aktivierten Zellen und Zytokine gelangen in das Leberparenchym, wo es zum Tod der Hepatozyten kommt. Ein attraktives Konzept dieses Aspekts der Pathogenese erscheint, dass TNF von Immunzellen ausgeschüttet wird und den Leberschaden durch die Bindung an den TNFR1 direkt auf den Parenchymzellen generiert^{45,77,80,81}.

In diesem Modell der akuten experimentellen Hepatitis spielt die TNF-TNFR1 Signalachse eine essentielle Rolle. Weitere Untersuchungen des in diesem Modell entstandenen Leberschadens können die Aufschlüsselung der Funktionsweise der TNF-TNFR1 Kaskade näherbringen und eventuell auf das Verständnis humaner Erkrankungen des akuten Leberschadens übertragen werden.

1.5.2 Das LPS/Gal Modell des akuten Leberschadens

Ein weiteres, sehr häufig angewandtes Modell für die Untersuchung von akutem Leberschaden ist das Lipopolysaccharid/Galactosamin (LPS/Gal) Modell. LPS ist ein Bestandteil Gram-negativer Bakterien und bekannt dafür, Prozesse zu induzieren, die je nach Dosis zum septischen Schock und Tod führen können⁸². Die zusätzliche Gabe des Aminozuckers Galactosamin induziert in Mäusen eine fulminante Hepatitis. Galactosamin wirkt unter anderem hepatotoxisch indem es die Transkription hemmt^{83,82}.

Bei der durch LPS/Gal induzierten fulminanten Hepatitis spielen TNF und TNFR1 eine entscheidende Rolle^{84,85}. LPS wird im Organismus von TLR4⁸⁶ erkannt und gebunden, wobei die TNF-Sezernierung von der Bindung von LPS an den TLR4 auf den Makrophagen abhängt⁸⁷.

Untersuchungen in SCID-Mäusen (severe combined immune deficiency), die aufgrund einer Mutation bei der Rekombination keine B- und T-Zell Rezeptoren ausbilden können, zeigten, dass diese Mäuse sensitiv auf die LPS/Gal Gabe reagieren. Da SCID-Mäuse aufgrund der Mutation keine funktionierenden B- und T-Zellen besitzen, ist davon auszugehen, dass diese Leberschädigung unabhängig von T-Zellen entsteht^{88,74}. Wie auch für den ConA-induzierten Leberschaden weiter oben beschrieben, wird ebenso für dieses Modell vorgeschlagen, dass TNF über Bindung an TNFR1 des Leberparenchyms, den Leberschaden induziert.

In Abbildung 3 ist schematisch die aktuell vorgeschlagene Funktionsweise dieses Modells dargestellt.

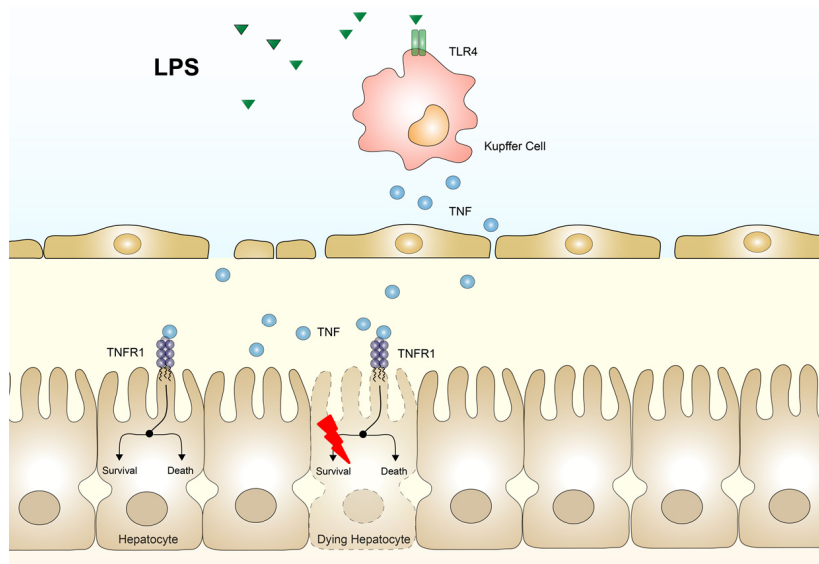


Abb. 3: Schematische Darstellung der vorgeschlagenen Funktionsweise des LPS/Gal Modells. LPS (grüne Dreiecke) bindet an den TLR4 (grün) auf Kupfer Zellen (rosa). Diese produzieren TNF (blau). TNF bindet an den TNFR1 auf den Parenchymzellen. Bei zusätzlicher Gabe von Gal wird der antiapoptotische Signalweg inhibiert (roter Blitz). Die TNF-TNFR1 Bindung führt in diesem Fall zum Tod der Zellen.

Das Modell der Pathogenese im LPS/Gal-vermittelten Leberschaden: LPS wird von TLR4 auf den leberresidenten Makrophagen, den Kupffer-Zellen, gebunden, die in Folge dessen Zytokine wie TNF produzieren. Die Bindung von TNF an TNFR1 führt entweder zu Aktivierung von NF- κ B und vermittelt somit antiapoptotische Signale oder zu der Aktivierung der Apoptose-Kaskade, wobei der primäre Weg der antiapoptotische ist^{39,48}. Ist die Transkription und somit die Aktivierung von NF- κ B durch die zusätzliche Gabe von Galactosamin inhibiert, führt die TNF-TNFR1 Signalkaskade zum Tod der Zellen (Abb. 3).

1.5.3 Das LPS Modell des septischen Schocks

Die Infektion mit Bakterien kann zu einer schweren Reaktion des Immunsystems führen, in deren Folge es zum oft tödlich verlaufenden septischen Schock kommen kann⁸⁹. Die Behandlung des Patienten mit Sepsis und insbesondere des septischen Schocks ist sehr schwierig. Neben der antibiotischen Behandlung bzw. Fokussanierung und einer Volumenersatztherapie zur Aufrechterhaltung des Kreislaufs stehen kaum wirksame und etablierte Modalitäten zur Verfügung. Pathogenetisch kommt es während der schweren Sepsis und des septischen Schocks zu einer massiven Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen woraus ein Multiorgan-Versagen resultieren kann. In der Sepsis kann die Leber ebenfalls bis hin zum Organversagen geschädigt werden⁹⁰. Andererseits werden durch die Leber selber immunmodulatorische Moleküle (sog. Akut-Phase-Proteine) freigesetzt, die ihrerseits pro- und anti-inflammatorische Wirkung haben können¹⁴. Es ist bereits seit langer Zeit bekannt, dass hohe Dosen LPS zu septischem Schock und Tod führen können, wobei die Dosis je nach Spezies sehr unterschiedlich sein kann⁸². TNF ist ein essentieller Mediator des LPS-induzierten Leberschadens⁹¹⁻⁹³. Zusätzlich sind in diesem Modell TNFR1^{-/-} Mäuse vor septischem Schock geschützt, was die wichtige Funktion von TNFR1 bei der Abwehr bakterieller Pathogene unterstreicht⁸⁴.

Um die genaue Funktionsweise der Leberschädigung in diesem Modell zu entschlüsseln muss die TNF-TNFR1 Achse genauer untersucht werden.

1.6 Konditioneller Knock-Out mit Hilfe des Cre/LoxP Systems

Für die verwendeten Modelle der Lebererkrankung, sowohl für das T-Zell-abhängige ConA Modell als auch für die T-Zell-unabhängigen LPS/Gal und LPS Modelle, sind Daten zu TNF und TNFR1 bekannt, die die essentielle Bedeutung dieser Faktoren im Verlauf der Krankheiten unterstreichen.

Diese Erkenntnisse sind unter anderem mit Hilfe von Knock-Out Mäusen entstanden, denen bestimmte Rezeptoren oder Proteine fehlen. Um die Rolle von TNFR1 genauer untersuchen zu können, wurde in dieser Arbeit mit konditionellen Knock-Out Mäusen gearbeitet, bei denen nur bestimmte Zellen des Organismus von einer Deletion betroffen sind, während alle anderen davon unberührt bleiben. So kann der Wirkungsort von TNFR1 in diesen Modellen genauer eingeschränkt werden.

Die verwendeten konditionellen Knock-Out Mäusen sind mit Hilfe des aus dem Bakteriophagen P1 bekannten Cre/LoxP Systems entstanden^{94,95}. Das zu der Klasse der Rekombinasen zählende Enzym Cre erkennt die 34 bp lange Sequenz LoxP^{95,96}. Ist ein DNA-Fragment gesäumt von LoxP-Erkennungssequenzen, kann die Cre-Rekombinase dieses Fragment aus dem Genom entfernen⁹⁷.

Zur Generierung konditioneller Knock-Out Mäuse wird das voll funktionsfähige Zielgen in embryonalen Stammzellen von LoxP-Erkennungssequenzen flankiert („gefloxt“). Wenn Tiere, die ein gefloxtes Gen exprimieren mit solchen gekreuzt werden, die die Cre-Rekombinase unter dem Einfluss eines bestimmten Promotors exprimieren, entstehen Nachkommen, bei denen das gefloxtes Zielgen zellspezifisch und in Abhängigkeit des Cre-Promotors deletiert wurde, während alle anderen Zellen des Organismus das Zielgen weiterhin exprimieren⁹⁸.

Diese Methode ermöglicht durch zellspezifische Deletionen nicht nur eine genauere Untersuchung von Signalwegen, sondern auch die Untersuchung von Genen deren globale Deletion sich im gesamten Organismus letal auswirkt, sodass keine Knock-Out Mäuse generiert werden können⁹⁷. Zudem kann durch entsprechende Wahl von transgenen Mäusen, die die Cre-Rekombinase nur in Anwesenheit eines Induktors (bspw. Tamoxifen) exprimieren, die Funktion eines Gens zeitlich beliebig gezielt ausgeschaltet werden⁹⁹.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle von Todesrezeptoren in verschiedenen Modellen immunmediierter Lebererkrankungen mit Hilfe von konditionellen TNFR1 Knock-Out Mäusen untersucht. Mäuse, in denen das TNFR1-Gen von LoxP-Erkennungssequenzen flankiert ist ($TNFR1^{FL/FL}$, $TNR1^{FL}$)¹⁰⁰, wurden mit Mäusen gekreuzt, die die Cre-Rekombinase unter dem Einfluss bestimmter Promotoren exprimieren. Ebenfalls wurden Mäuse, in denen die Gene der drei Todesrezeptoren TNFR1, Fas und TRAIL gefloxt sind ($3DR^{FL}$)⁵², verwendet. In dieser Arbeit wurden Mauslinien verwendet, die die Cre-Rekombinase unter dem Einfluss des Albumin Promotors und Enhancers und des AFP (α -Fetoprotein) Enhancers exprimieren und somit die Deletion in Hepatozyten und Cholangiozyten ermöglicht¹⁰¹. Außerdem wurden Mauslinien zur Kreuzung verwendet, die die Cre-Rekombinase unter dem Einfluss folgender Promotoren exprimieren: des T-Zell-spezifischen Promotors CD4¹⁰², Endothel-spezifischen VE-Cadherin-Promotors¹⁰³ und des LysM-

Promotors, der unter anderem spezifisch auf Makrophagen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten exprimiert wird¹⁰⁴.

1.7 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Rolle von Todesrezeptoren in immunvermittelten Lebererkrankungen näher untersucht werden. Hierzu wurden verschiedene Krankheitsmodelle herangezogen und mit Hilfe von Mauslinien mit konditionellem Knock-Out untersucht. Aufgrund von Vorarbeiten und Literaturrecherchen konnten folgende Hauptziele formuliert werden:

1. Untersuchung der Rolle von Todesrezeptoren, vor allem TNFR1, im Concanavalin A Modell der akuten experimentellen Hepatitis.

Für dieses Modell der experimentellen Hepatitis wurde die Wichtigkeit der Todesrezeptoren und der TNF/TNFR1 Signalachse bereits beschrieben. Das systemische Fehlen sowohl von TNF als auch von TNFR1 führt zu komplettem Schutz vor ConA-induzierter Leberschädigung^{77,78}. Um die genaue Funktionsweise dieses Modells zu entschlüsseln, soll der genaue Wirkungsort der die TNF/TNFR1 Signalkaskade initiiert, untersucht werden. Es wurde bereits mehrmals vorgeschlagen, dass die Leberschädigung in diesem Modell durch die direkte Bindung von TNF an den TNFR1 auf dem Leberparenchym entsteht^{45,77,80,81}. Um diese Hypothese zu untersuchen wurden Tiere mit konditionellem Knock-Out des Adaptorproteins FADD verwendet. Zusätzlich sollte der genaue Wirkungsort der TNF/TNFR1 Signalkaskade ermittelt werden. Hierfür sollten zunächst Mauslinien generiert werden, die einen zellspezifischen Knock-Out des TNFR1 auf Zellen des Leberparenchyms (TNFR1^{LPC-KO}), auf Zellen des angeborenen Immunsystems, vornehmlich Makrophagen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten (TNFR1^{MDC-KO}), auf T-Zellen (TNFR1^{TC-KO}) und auf Endothelzellen (TNFR1^{EC-KO}) haben. Mit Hilfe dieser Mauslinien soll die genaue Funktionsweise von TNF im Modell der T-Zell-vermittelten experimentellen Hepatitis untersucht werden.

2. Untersuchung der Rolle von TNFR1 im LPS/Gal Modell des akuten Leberversagens.

Im ebenfalls häufig verwendeten LPS/Gal Modell des akuten Leberversagens, wurde die essentielle Bedeutung sowohl von TNF als auch von TNFR1 beschrieben^{84,85}. Wie in dem Modell der akuten experimentellen Hepatitis, sind auch hier die Makrophagen von großer Bedeutung: LPS wird von dem TLR4 auf den Makrophagen gebunden und somit vom Organismus erkannt⁸⁷. Die zusätzliche Gabe des Transkriptionsinhibitors Gal führt zur Induktion einer fulminanten Hepatitis^{82,83}. Im Gegensatz zu

dem Concanavalin A Modell findet der Leberschaden jedoch unabhängig von T-Zellen statt⁷⁴. Der Leberschaden wird in diesem Fall von den Zellen der angeborenen Immunantwort vermittelt. Um diese Art des Leberversagens näher zu untersuchen, soll im Rahmen dieses Projekts der Wirkungsort der TNF/TNFR1 Signalachse mit Hilfe konditioneller Knock-Out Mäuse untersucht werden. Hierfür sollen die zuvor generierten Mauslinien mit zellspezifischem TNFR1 Knock-Out auf Zellen des Leberparenchyms (TNFR1^{LPC-KO}), auf Makrophagen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten (TNFR1^{MDC-KO}), auf T-Zellen (TNFR1^{TC-KO}) sowie auf Endothelzellen (TNFR1^{EC-KO}) im Modell des LPS/Gal-induzierten Leberversagens untersucht werden.

3. Untersuchung der Rolle von TNFR1 im LPS Modell des septischen Schocks.

Auch im Modell des septischen Schocks wurde die Wichtigkeit der TNF/TNFR1 Signalwege beschrieben. Sowohl das proinflammatorische Zytokin TNF, als auch der TNFR1 spielen bei der Abwehr bakterieller Pathogene eine entscheidende Rolle^{84,91-93}. Im Falle eines septischen Schocks kommt es in Folge massiver Zytokinproduktion zum Multiorgan-Versagen⁹⁰. Die genaue Funktionsweise ist jedoch nicht vollständig aufgeklärt. Um die genaue Rolle von TNFR1 in diesem Modell untersuchen zu können, wurden im Rahmen dieses Projekts die zuvor generierten Mauslinien mit konditionellem TNFR1 Knock-Out verwendet. So konnte die zellspezifische Rolle von TNFR1 auf Zellen des Leberparenchyms (TNFR1^{LPC-KO}), auf bestimmten Zellen der angeborenen Immunantwort (TNFR1^{MDC-KO}), auf T-Zellen (TNFR1^{TC-KO}) sowie auf Endothelzellen (TNFR1^{EC-KO}) untersucht werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Laborgeräte

Bezeichnung	Firma
-20 °C Gefrierschrank Liebherr Comfort	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
-80 °C Gefrierschrank Ultra Guard UF V	Binder GmbH, Tuttlingen
Analysewaage ME1002	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Cobas Integra 400 plus	Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz
Durchflusszytometer LSRFortessa™	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Sorter FACSAriaIII	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Gelelektrophoresekammer 41-2340	PEQLAB Biotechnologies GmbH, Erlangen
Hämatologie Analyse-Gerät Hemavet 950 FS	DREW Scientific Inc., Oxford, CT, USA
Heizblock TS-100	PEQLAB Biotechnologies GmbH, Erlangen
Kühlschrank Liebherr Premium	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
Magnetrührer RH-Basic 2	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikroskop BZ-9000 Bioevo	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg
Mikrotom HM 335 E	Microm, Walldorf
Mikrowelle	Bosch, München
Molecular Imager® ChemiDoc™XRS+ Imaging System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Multi-Reader Tecan infinite® M200	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Neubauer Zählkammer	Optik Labor Frischknecht, Balgach
PCR Cycler peqstar 2x Gradient	PEQLAB Biotechnologies GmbH, Erlangen
pH-Meter FG2-FiveGO™	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Pipetten Eppendorf Research® Plus	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe pipetus® standard	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Power Supply Model 1000/500	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
RealTimePCR System StepOnePlus™	Applied Biosystems / Life Technologies GmbH, Darmstadt
Schüttler MX-S	Dragon Laboratory Instruments Limited, Beijing, China
Spectrophotometer NanoDrop 2000	ThermoScientific Inc., Wilmington, USA
Sterile Werkbank MSC-Advantage™	ThermoScientific Inc., Wilmington, USA
Tecan M8/2R ELISA washer	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Tischzentrifuge 5424R	Eppendorf AG, Hamburg,
Wärmeplatte Präzitherm PZ35	Harry Gestigkeit GmbH, Düsseldorf
Wasserbad	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Wippschüttler MR-1	peqlab Biotechnologies GmbH, Erlangen
Zellkulturzentrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg
Operations-Besteck	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg

2.1.2 Glas- und Kunststoffverbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Firma
0,2 mL Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
1,5 mL Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht

15 mL Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
2 mL Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
5 mL Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
5 mL Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
50 mL Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht; Greiner-Bio-One, Frickenhausen
96 Well Platten Nunc MaxiSorb	Thermo Fischer Scientific Inc., Schwerte
Deckgläser 24x50 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
EDTA-Röhrchen, 1 mL	KABE LABORTECHNIK GmbH, Nümbrecht-Elsenroth
Einfrierröhrchen Cryo Pure Tubes	Sarstedt, Nümbrecht
Kanülen (20 G)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kanülen (26 G, 24 G) BD Microlance™	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Mikrotiterplatte für qRT-PCR MicroAmp® Fast Optical 96-well Plate	Applied Biosystems by life technologies, Darmstadt
Mikrotom-Klingen S35	Feather Safety Razor Co., LTD., Osaka, Japan
Nylonsieb CellStrainer 70µm, BD Falcon™	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Nylonsieb CellTrics® 30µm	Partec GmbH, Görlitz
Pipettenspitzen (10 µL, 200 µL, 1000 µL)	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen (0,5 mL) BD Micro-Fine™+	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Spritzen (1 mL, 10 mL)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Super Frost Objektträger 75x25 mm	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim
Rotilabo®-Einbettkassetten	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems by life technologies, Darmstadt

2.1.3 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, bei den Firmen Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim) bezogen.

2.1.4 Antikörper und Farbstoffe

2.1.4.1 Antikörper für Immunhistochemie

Bezeichnung	Firma
Anti F4/80 Rat Monoclonal, Klon A3-1	abcam, Cambridge, England
Anti Ly6G Rat Monoclonal, Klon 1A8	BioXCell, West Lebanon, NH, USA
Goat Anti Rat Peroxidase Conjugated	Dianova GmbH, Hamburg
Rabbit Anti Rat Immunoglobulins HRP Conjugated	DAKO, Glostrup, Dänemark

2.1.4.2 Antikörper und Farbstoffe für die Durchflusszytometrie

Bezeichnung	Fluorochrom	Klon	Firma
α mouse Ly6C	PE	HK1.4	BioLegend, San Diego, CA, USA
α mouse GR-1	PerCP	RB6-8C5	BioLegend, San Diego, CA, USA
α mouse F4/80	APC	BM8	BioLegend, San Diego, CA, USA
α mouse CD11b	PE/Cy7	M1/70	BioLegend, San Diego, CA, USA
α mouse CD45	FITC	30-F11	BioLegend, San Diego, CA, USA
α mouse CD4	PerCP	RM4-5	BioLegend, San Diego, CA, USA
α mouse CD3	PE	17A2	BioLegend, San Diego, CA, USA
α mouse CD8	APC/Cy7	53-6.7	BioLegend, San Diego, CA, USA
α mouse NK1.1	PE/Cy7	PK136	BioLegend, San Diego, CA, USA
DAPI			BioLegend, San Diego, CA, USA
α mouse TruStain fcX™		93	BioLegend, San Diego, CA, USA

2.1.5 Kits

Bezeichnung	Firma
ELISA MAX™ Standard Set Mouse IL-6	BioLegend, San Diego, CA, USA
ELISA MAX™ Standard Set Mouse IL-4	BioLegend, San Diego, CA, USA
ELISA MAX™ Standard Set Mouse TNF-α	BioLegend, San Diego, CA, USA
ELISA MAX™ Standard Set Mouse IFN-γ	BioLegend, San Diego, CA, USA
ELISA MAX™ Standard Set Mouse IL-10	BioLegend, San Diego, CA, USA
Quantikine® ELISA Mouse IL-1β/IL-1F2	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Quantikine® ELISA Mouse CXCL2/MIP-2	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
TMB Substrate A+B	BioLegend, San Diego, CA, USA
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA
Liquid DAB+Substrate Chromogen System	DAKO, Glostrup, Dänemark
Negative Control Compensation Beads	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
KAPA™ Probe Fast Universal	peqlab Biotechnologies GmbH, Erlangen

2.1.6 Primer

2.1.6.1 Primer für PCR

Die für die Genotypisierung der Mäuse verwendeten Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert.

Bezeichnung	Sequenz [5' → 3']
Cre (Vorwärts)	GTC CAA TTT ACT GAC CGT ACA C
Cre (Rückwärts)	CTG TCA CTT GGT CGT GGC AGC
AFP Cre (Vorwärts)	TCC AGA TGG CAA ACA TAC GC
AFP Cre (Rückwärts)	GTG TAC GGT CAG TAA ATT GGA C
LysM Cre (Vorwärts)	CTT GGG CTG CCA GAA TTT CTC
LysM Cre (Rückwärts)	CCC AGA AAT GCC AGA TTA CG

TNFR1 FL (Vorwärts)	CAA GTG CTT GGG GTT CAG GG
TNFR1 FL (Rückwärts)	CGT CCT GGA GAA AGG GAA AG
FASFL (Vorwärts)	TGC AGT TGC TGA GAT GAA CCA TTT TCT CTG TCT
FASFL (Rückwärts)	GGC TTT GGA AAG GAA TTT CCT CCT AAG AGG
TRAILRFL (Vorwärts)	GA CGA TTA TGG GCT GGG TTA GCT G
TRAILRFL (Rückwärts)	CG AAC ACA GCT GGT TTC CAT GG

2.1.6.2 Sonden für die qRT-PCR

Die für die qRT-PCR verwendeten Sonden wurden von der Firma life technologies (Carlsbad, CA, USA) synthetisiert.

Bezeichnung	Sondennummer
GAPDH	Mm99999915_g1
CXCL1	Mm04207460_m1
CXCL9	Mm00434946_m1
CXCL10	Mm00445235_m1
CXCL11	Mm00444662_m1
CXCL16	Mm00469712_m1
CCL2	Mm00441242_m1
CCL20	Mm01268754_m1
TGFβ	Mm00488393_m1

2.1.7 Chemikalien für in vivo Studien

Bezeichnung	Bezugsort
Concanavalin A	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
LPS <i>E.coli</i> 0111:B4	InvivoGen Europe, Toulouse, Frankreich
D-Galactosamine x HCl	Genaxxon Bioscience, Ulm
PBS	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
αIL-10R mouse Hybridoma Antikörper	Zur Verfügung gestellt von Prof. Samuel Huber, UKE

2.1.8 Puffer und Lösungen

1 x PBS, pH 7,4	
KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
NaCl	137 mM
Na ₂ HPO ₄	6,5 mM

1 x PBS-T
1 x PBS + 0,005 % Tween®20

1 x T/E (Tris/EDTA) Puffer, pH 8,0
 Tris-HCl 10 mM
 EDTA 1 mM

1 x Tail Lysis Puffer
 Tris-HCl, pH 8,5 100 mM
 EDTA 5 mM
 NaCl 200 mM
 SDS 0,2 %

1 x Erythrozyten Lysis Puffer, pH 7,43
 NH₄Cl 155 mM
 KHCO₃ 10 mM
 EDTA 0,1 mM

1 x Coating Puffer (ELISA), pH 9,5
 NaHCO₃ 100 mM
 Na₂CO₃ 33,6 mM

10 x TBE Puffer (Agarosegelelektrophorese)
 Tris-HCl 0,9 M
 H₃BO₃ 0,9 M
 EDTA 20 mM

4 %ige Paraformaldehyd-Lösung (1L, pH 7,4)
 Paraformaldehyd (95 % Reinheit) 42 g
 10 x PBS 50 mL
 1M NaOH 3-5 Tropfen
 ddH₂O ad 1000 mL

2.1.9 Agentien

Bezeichnung	Firma
DreamTaq™ DNA Polymerase	Thermo Scientific Inc., Wilmington, USA
DreamTaq™ Green Buffer	Thermo Scientific Inc., Wilmington, USA
2mM dNTP Mix	Thermo Scientific Inc., Wilmington, USA
FastRuler Low Range DNA Ladder	Thermo Scientific Inc., Wilmington, USA
Proteinase K	Thermo Scientific Inc., Wilmington, USA
peqGREEN DNA/RNA Dye	peqlab Biotechnologies GmbH, Erlangen
UltraPure™ Agarose	Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA
BSA Albumine Bovine Fraction V	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Eukitt®	O. Kindler GmbH, Freiburg
FCS	PAA Laboratories/GE Healthcare Life Sciences Europe GmbH, Freiburg
Percoll™	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden
DMEM Zellkultur Medium	gibco® by life technologies™, Darmstadt
peqGOLD TriFast™FL	peqlab Biotechnologies GmbH, Erlangen
DEPC-Ultra Pure Wasser	Invitrogen by life technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Protein Block, Serum Free	DAKO, Glostrup, Dänemark
Antibody Diluent	DAKO, Glostrup, Dänemark
Ziegen-Serum	DAKO, Glostrup, Dänemark

2.1.10 Versuchstiere

Für die *in vivo* Studien dieser Arbeit wurden folgende Mauslinien verwendet:

Bezeichnung	Herkunft
TNFR1 ^{LPC-KO}	TNFR1 ^{FL} Prof. Kollias, Biomedical Sciences Research Center "Alexander Fleming," Vari, Griechenland; Prof. Pasparakis, Institut für Genetik, Universität Köln
3DR ^{LPC-KO}	Gekreuzt aus Mäusen vom Institut für Genetik ⁵² , Universität Köln (Prof. Pasparakis)
TNFR1 ^{TC-KO}	TNFR1 ^{FL} Prof. Kollias, Biomedical Sciences Research Center "Alexander Fleming," Vari, Griechenland; CD4-Cre VTH UKE Hamburg
TNFR1 ^{EC-KO}	TNFR1 ^{FL} Prof. Kollias, Biomedical Sciences Research Center "Alexander Fleming," Vari, Griechenland; Cdh5-Cre Jackson Lab.
TNFR1 ^{MDC-KO}	TNFR1 ^{FL} Prof. Kollias, Biomedical Sciences Research Center "Alexander Fleming," Vari, Griechenland; LysM-Cre (I. Förster) VTH UKE Hamburg
C57B/6J WT	VTH UKE Hamburg
FADD ^{LPC-KO}	Prof. Pasparakis, Institut für Genetik ¹⁰⁰ , Universität Köln
TNFR1 ^{-/-}	Prof. Pasparakis, Institut für Genetik ¹⁰⁰ , Universität Köln

Da es sich bei diesen Mauslinien um transgene Tiere handelt, wurde jede Maus mittels Polymerasekettenreaktion genotypisiert (2.2.2.2).

2.1.11 Software und Datenbanken

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

FACSDiva 6, BD Pharmingen, Heidelberg

FlowJo 10, FlowJo LLC, Ashland, OR, USA

www.myAssays.com

GraphPad PRISM[®] 6.01, GraphPad Software Inc., San Diego, USA

StepOnePlus[™] V2.1, Applied Biosystems by life technologies, Darmstadt

ImageJ 1.48, <http://imagej.nih.gov/ij>

Magellan6, Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz

Quantity One 4.6, Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Mendeley Desktop 1.14, Mendeley Ltd, London, UK

2.2 Methoden

2.2.1 *in vivo* Studien

Alle *in vivo* Experimente mit den Mauslinien TNFR1^{LPC-KO}, 3DR^{LPC-KO}, TNFR1^{TC-KO}, TNFR1^{EC-KO} und TNFR1^{MDC-KO} (2.1.10) wurden am UKE-Hamburg durchgeführt und ausgewertet. Die FADD^{LPC-KO}- sowie TNFR1^{-/-}-Experimente wurden von Dr. med. Hanno Ehken an der Universität Köln durchgeführt und am UKE-Hamburg ausgewertet.

Die für die *in vivo* Studien dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden in der Versuchstierhaltung (VTH) der Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter keimarmen Bedingungen, bei einer konstanten Raumtemperatur von 20 °C mit Wasser und Futter *ad libitum* gezüchtet und gehalten.

Da es sich um transgene Linien handelt, wurde jedes Tier mittels PCR (2.2.2.2) genotypisiert.

Sämtliche am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführten Studien wurden im Rahmen der Tierversuchsgenehmigung 86/11 (Hamburg) durchgeführt.

Für die Charakterisierung der durch Kreuzung neu entstandenen Linien wurden Tiere im Alter von 9 - 12 und 50- 90 Wochen untersucht.

Für die Concanavalin A (ConA) sowie ConA/Gal und ConA/ α IL-10R Studien wurden Geschwistertiere selben Geschlechts aller Linien im Alter von 9 - 12 Wochen verwendet.

Die Verabreichung von 6 - 9 mg/kg Concanavalin A erfolgte stets gewichtsadaptiert i.v. in einem definierten Volumen von 200 μ L. Die Gabe von α IL-10R (150 μ g/Maus) und Gal (700 mg/kg) erfolgte stets i.p. Die Tiere wurden über einen definierten Zeitraum beobachtet (1-8 h). Kontrolltiere erhielten jeweils das gleiche Volumen PBS.

Für die LPS und LPS / Gal Studien wurden stets Geschwistertiere selben Geschlechts im Alter von 12- 30 Wochen verwendet. Die Verabreichung von LPS (40 μ g/kg bzw. 20 mg/kg) und Gal (700 mg/kg) erfolgte gewichtsadaptiert i.p. in einem definierten Volumen von 250 μ L. Die Tiere wurden über einen definierten Zeitraum beobachtet (bis zu 120 h).

Am Ende des Versuches wurden die Tiere mittels CO₂-Intoxikation sakrifiziert. Die Organe wurden wie unter 2.2.3 beschrieben weiterverarbeitet.

2.2.2 Genotypisierung

2.2.2.1 DNA- Aufreinigung aus Schwanzbiopsien

Für die Genotypisierung von Mäusen wurde die genomische DNA aus Schwanzbiopsien isoliert. Für den Verdau wurden die Schwanzbiopsien ÜN in Tail Lysis Puffer mit Proteinase K (2.1.9) bei 55 °C im Wasserbad inkubiert.

Um Gewebereste zu sedimentieren wurden die Schwanzbiopsien für 5 min bei 13000 rpm und 4 °C in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit je 500 µL Isopropanol versetzt und erneut für 5 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach diesem Fällungsschritt wurde der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde in jeweils 500 µL 70 %igem Ethanol resuspendiert und erneut 5 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das DNA-Pellet bei RT getrocknet und für die Weiterverwendung in jeweils 200 µL T/E Puffer aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

2.2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) werden DNA-Abschnitte mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotiden („Primern“) amplifiziert die anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (2.2.2.3) visualisiert werden können. Die PCR beruht auf die Wiederholung dreier Schritte:

1. Denaturierung des DNA-Doppelstranges;
2. Hybridisierung der spezifischen Primer;
3. Verlängerung des neuen Stranges, der dem Ursprungsstrang identisch ist.

Ein PCR-Ansatz für eine Reaktion setzte sich folgendermaßen zusammen:

Puffer 10x	3 µL
nNTPs 2mM	3 µL
Primer Vorwärts 1:10	0,9 µL
Primer Rückwärts 1:10	0,9 µL
DreamTaq™ DNA Polymerase 5 U / µL	0,5 µL
DNA	1 µL
ddH ₂ O ad	30 µL

Für die DNA Amplifikation wurde folgendes Programm benutzt, wobei die Temperatur und die Zyklenanzahl den jeweiligen Primer-Paaren angepasst wurden:

94 °C	3-5	min	
94 °C	30	sec	x 29-35
59-62 °C	30-60	sec	
72 °C	30-60	sec	
72 °C	2-7	min	

2.2.2.3 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese können Nukleinsäuren anhand ihrer Größe in einer Agarosematrix in einem elektrischen Feld zwecks Identifikation getrennt werden. Aufgrund der negativen Gesamtladung der Nukleinsäuren wandern diese im elektrischen Feld ausschließlich zur Anode, wobei die Wandereigenschaften von der Maschengröße des Agarosegels abhängen. Große Nukleinsäure-Fragmente wandern somit langsamer als kleine und sind im Gel näher an der Kathode sichtbar.

Für die Analyse der DNA wurde Agarose abgewogen (Endkonzentration 1 % - 2 %) und bei 100 °C in TBE Puffer gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 60 - 70 °C wurde für die spätere Visualisierung der DNA-Fragmente peqGreen (2.1.9) hinzugefügt. Der Farbstoff interkaliert in die DNA und erzeugt im UV-Licht Fluoreszenz. Anschließend wurden horizontale Gele gegossen. Nach Erkalten des Gels wurden die Proben in die Taschen pipettiert. Für die Einschätzung der Größe der Nukleinsäure-Fragmente erfolgte parallel die Auftrennung eines Längenstandards mit Fragmenten bekannter Größe. Die Elektrophorese erfolgte ebenfalls in TBE Puffer. Anschließend wurden die Gele zur Dokumentation fotografiert.

2.2.3 Organpräparation

Nach Beenden des Versuches wurden die Tiere mittels CO₂-Intoxikation sakrifiziert. Zunächst wurde das Bauchfell abpräpariert. Nach vorsichtigem Öffnen des Peritoneum und der Diaphragma wurde das Herz mit einer Kanüle punktiert, das Blut entnommen und entweder bei RT in ein EDTA-Röhrchen oder auf Eis in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gelagert. Anschließend wurde die Leber entnommen und in mehrere Segmente unterteilt.

Jeweils ein zentraler Streifen dreier Leberlappen wurde über Nacht in 4 %iger Paraformaldehydlösung bei 4 °C gelagert. Die Entwässerung und Einbettung der Organe in Paraffin

erfolgte am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Ein weiterer Teil der Leber wurde für durchflusszytometrische Analysen (2.2.8) zunächst in ein 15 mL Gefäß mit 5 mL Zellkulturmedium (DMEM, 10 % FCS) bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis inkubiert. Für spätere RNA-Analysen (2.2.10) wurde ein Stück Leber bei -80 °C gelagert.

Die Milz wurde entnommen, gemessen und für durchflusszytometrische Analysen (2.2.8) ebenfalls in ein 15 mL Gefäß mit 5 mL Zellkulturmedium (DMEM, 10 % FCS) bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis inkubiert.

2.2.4 Bestimmung der Alanin-Aminotransferase aus dem Serum

Das intrakardial entnommene Blut (2.2.3) wurde bis zur Weiterverarbeitung auf Eis inkubiert und anschließend, um Hämolyse zu vermeiden, zunächst in der Tischzentrifuge für 5 min bei 5500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, 12500 rpm, 4 °C) konnte das Serum als obere Phase abgenommen werden und wurde bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert. Die Messung der Alanin-Aminotransferase erfolgte am UKE-Hamburg in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Tiegs.

2.2.5 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Zytokine aus dem Plasma wurden mittels ELISA-Kits (2.1.5) quantitativ analysiert, die nach Angaben des Herstellers verwendet wurden. Zunächst wurden die Wells einer 96-well MaxiSorp Platte über Nacht bei 4 °C mit einem in Coating Puffer verdünnten Capture Antikörper gegen das zu untersuchende Zytokin inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte ausgeschlagen und nicht gebundene Partikel wurden durch viermaliges Waschen mit PBS-T entfernt. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit einer Proteinlösung bei Raumtemperatur für mindestens zwei Stunden abgesättigt.

Anschließend wurden nicht gebundene Partikel durch viermaliges Waschen mit PBS-T entfernt. Damit die Antigene der zu untersuchenden Probe an die bereits gebundenen Antikörper binden können, wurden die Proben und der Referenz-Standard in die Wells pipettiert und die Platte wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte erneut vier Mal mit PBS-T gewaschen. Die Wells wurden anschließend mit dem verdünnten Detektions-Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und Ungebundenes anschließend durch viermaliges Waschen mit PBS-t entfernt. Der Detektions-Antikörper konnte so an die bereits an den Capture Antikörper gebundenen Antigene binden. Während die Platte für 30 min bei

Raumtemperatur mit verdünnter Avidin-Peroxidase inkubiert wurde, konnte das Enzym an den biotinylierten Detektions-Antikörper binden. Nach Entfernen der nicht gebundenen Partikel durch viermaliges Waschen mit PBS-T erfolgte die Entwicklung der Platte. Hierfür wurde die frisch angesetzte TMB-Substratlösung dazu pipettiert und die Platte wurde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und dabei immer wieder beobachtet. Bei Substratumsetzung durch die Peroxidase entsteht eine blaue Färbung. Nach Eintreten der Färbung wurde die Reaktion mittels 1 M Schwefelsäure gestoppt und die Substratumsetzung wurde im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Pufferkontrolle photometrisch analysiert.

2.2.6 Untersuchungen auf histologischer Ebene

Die nach Beenden eines Versuches wie unter 2.2.3 beschrieben entnommenen Organe wurden wie folgt histologisch analysiert.

2.2.6.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Aus den in Paraffin eingebetteten Organen (2.2.3) wurden am Mikrotom 3 µm dicke Schnitte angefertigt, die zuerst in ein 37 °C warmes Wasserbad gestreckt und anschließend auf Super Frost Objektträger gebracht wurden. Nach einer Trocknungszeit von 24 h bei 37 °C wurden die Schnitte gefärbt.

2.2.6.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Bei dieser Färbung werden basophile Strukturen im Gewebe mittels Hämatoxylin blau gefärbt, während basische Strukturen von Eosin rot angefärbt werden. Für die Färbung muss der Farbstoff Hämatoxylin zu Hämaun oxidiert werden. Die mit Hämaun gefärbten Strukturen erscheinen zunächst rötlich. Durch die Erhöhung des pH-Wertes mittels Leitungswasser schlägt der Farbton in blau um („Bläueln“).

Nach Einbettung der Organe in Paraffin (2.2.3) wurden die am Mikrotom erstellten Schnittpräparate (2.2.6.1) nach folgendem Protokoll gefärbt:

1. Entparaffinierung
3 x 5 min Xylol
2. Rehydrieren
4 min Ethanol absolut
4 min Ethanol 90 %
4 min Ethanol 70 %
4 min Ethanol 50 %
2 min VE-H₂O
3. Färbung
10 min Hämalaun-Lösung nach Mayer
5 sec VE-H₂O
4. „Bläueln“
15 min Fließendes Leitungswasser
2 min VE-H₂O
5. Gegenfärbung
1 min Eosin G Lösung
5 sec VE-H₂O
6. Dehydrieren
2 sec Ethanol 50 %
30 sec Ethanol 70 %
1 min Ethanol 90 %
2 min Ethanol absolut
2 min Ethanol absolut
7. Fixieren
3 x 3 min Xylol
8. Eindecken

Im Anschluss wurden die Schnittpräparate am Durchlichtmikroskop ausgewertet.

2.2.6.3 Immunhistochemische Färbung der Makrophagen im Lebergewebe

Für die Quantifizierung von Makrophagen im Lebergewebe wurden die in Paraffin eingebetteten Organe am Mikrotom geschnitten (2.2.6.1) und anschließend mit einem spezifisch an das von Makrophagen exprimierende Antigen F4/80 bindenden Antikörper immunhistochemisch gefärbt. Hierfür wurde nach folgendem Protokoll verfahren:

Zuerst wurden die Präparate durch dreimalige Inkubation in ein Xylolbad für jeweils 5 min entparaffiniert. Anschließend wurden die Organschnitte mittels einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert. Hierfür wurden die Präparate jeweils 5 min in ein Bad mit Ethanol absolut, Ethanol 90 %, Ethanol 70 %, Ethanol 50 % und anschließend in VE-H₂O inkubiert. Die endogenen Peroxidasen wurden durch 30minütige Inkubation in 3 % H₂O₂ (in Methanol) blockiert. Die Präparate wurden anschließend 3 Mal für je 3 min in PBS-T gewaschen und anschließend, um die unspezifischen Bindungen abzusättigen, in der feuchten Kammer bei RT für 30 min mit Protein Block (2.1.9) inkubiert. Für die Bindung des primären Antikörpers an das von Makrophagen exprimierte Antigen F4/80 wurden die Schnitte mit dem 1:200 mit Antibody Diluent (2.1.9) verdünnte Antikörper Anti F4/80 für 1 h in der feuchten Kammer bei RT inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Präparate mit Ziegen-Serum (2.1.9, 1:50 in PBS) für 30 min in der feuchten Kammer bei RT inkubiert. Dieser Schritt dient der Reduzierung unspezifischer Bindungen des sekundären Antikörpers. Anschließend wurden die Organschnitte für 30 min in der feuchten Kammer bei RT mit dem gegen den primären Antikörper gerichtete sekundäre Antikörper inkubiert (2.1.4.1). Nach erneutem Waschen folgte die Visualisierung der Färbung. Hierfür wurden die Schnitte für ca. 2 min in DAB-Substratlösung (1:50, 2.1.5) bis zum Erscheinen einer bräunlichen Färbung inkubiert. Die Reaktion wurde mit VE-H₂O gestoppt. Für eine bessere Beurteilung der Präparate wurden die Zellkerne durch 3 minütige Inkubation in Hämalaun gefärbt. Durch eine 5 minütige Inkubation in fließendem Leitungswasser wird der pH der Schnitte geändert und die zuvor in Hämalaun gefärbten Zellkerne erscheinen bläulich. Es folgte eine Dehydrierung der Präparate mittels aufsteigender Ethanolreihe. Hierfür wurden die Organschnitte für jeweils 3 min in Ethanol 50 %, Ethanol 70 %, Ethanol 90 % und Ethanol absolut inkubiert. Es folgte eine Fixierung in Xylolbad durch dreimalige Inkubation für jeweils 3 min. Anschließend wurden die Präparate eingedeckt und mikroskopisch analysiert.

2.2.6.4 Immunhistochemische Färbung der neutrophilen Granulozyten im Lebergewebe

Für die Visualisierung neutrophiler Granulozyten im Lebergewebe wurden die zuvor am Mikrotom angefertigten Organschnitte (2.2.6.1) mittels eines spezifisch an das von neutrophilen Granulozyten exprimierte Protein Ly6G bindenden Antikörpers immunhistochemisch gefärbt. Hierfür wurde folgendes Protokoll verwendet:

Die Entparaffinierung der Organschnitte erfolgte mittels dreimaliger 5 minütiger Inkubation in ein Xylolbad. Es folgte die Rehydrierung der Präparate mit Hilfe einer absteigenden Ethanolreihe bei der die Schnitte für 5 min in ein Bad mit Ethanol absolut und jeweils 2 min in ein Bad mit Ethanol 90 %, Ethanol 70 %, Ethanol 50 % und schließlich VE-H₂O inkubiert wurden. Die endogenen Peroxidasen

wurden durch die 10 minütige Inkubation in ein Methanol-Gemisch mit 3 % H₂O₂ blockiert. Die Präparate wurden 3 Mal jeweils 2 min mit PBS-T gewaschen und für 30 min in der feuchten Kammer zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit Protein Block (2.1.9) inkubiert. Anschließend wurde der primäre, gegen das Protein Ly6G gerichtete Antikörper (1:100 mit Antibody Diluent, 2.1.9) auf die Schnitte pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 h in der feuchten Kammer wurde überschüssiger Antikörper in einem Waschschrift entfernt. Der gegen den primären Antikörper gerichtete, sekundäre Antikörper (2.1.4.1) wurde in einer Verdünnung von 1:200 (mit Antibody Diluent, 2.1.9) für 1 h auf die Organschnitte pipettiert und in der feuchten Kammer inkubiert. Überschüssige Flüssigkeit wurde anschließend in einem Waschschrift entfernt. Für eine bessere Visualisierung wurde ein tertiärer, HRP-gekoppelter Antikörper verwendet, der gegen den sekundären Antikörper gerichtet ist und eine höhere HRP-Dichte aufweist. Hierfür wurden die Schnitte zunächst, um unspezifische Bindungen zu reduzieren, für 30 min in der feuchten Kammer bei RT mit 2 % Serum (verdünnt mit PBS) der gleichen Spezies inkubiert, aus der der tertiäre Antikörper stammt. Anschließend wurden die Präparate für 30 min in der feuchten Kammer mit dem tertiären Antikörper (2.1.4.1) inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde anschließend in einem Waschschrift entfernt. Die Visualisierung erfolgte mittels DAB-Inkubation. Die Schnitte wurden für wenige Sekunden, bis eine bräunliche Färbung sichtbar wurde, mit DAB-Substratlösung (1:50, 2.1.5) inkubiert, die Reaktion wurde in VE-H₂O gestoppt. Für eine bessere Beurteilung der Präparate wurden die Zellkerne 2,5 min in Hämalaun gefärbt. Durch eine 3 minütige Inkubation in fließendem Leitungswasser wird der pH der Schnitte geändert und die zuvor in Hämalaun gefärbten Zellkerne erscheinen bläulich. Es folgte eine Dehydrierung der Präparate mittels aufsteigender Ethanolreihe. Hierfür wurden die Organschnitte für jeweils 2 min in Ethanol 50 %, Ethanol 70 %, Ethanol 90 % und Ethanol absolut inkubiert. Es folgte eine Fixierung in Xylolbad durch dreimalige Inkubation für jeweils 3 min. Anschließend wurden die Präparate eingedeckt und mikroskopisch analysiert.

2.2.6.5 Mikroskopische Analysen und Quantifizierung

Die gefärbten Präparate wurden zur Untersuchung am Mikroskop betrachtet. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit Hilfe des Programmes ImageJ ausgewertet. Zunächst wurden repräsentative Aufnahmen in 100facher Vergrößerung gemacht. Für die Quantifizierung geschädigter Leberareale wurden von jedem Präparat 10 Bilder in 100facher Vergrößerung aufgenommen und anschließend ausgewertet. Die Bestimmung der Anzahl der Makrophagen im Lebergewebe erfolgte anhand von 10 Aufnahmen pro Präparat in 200facher Vergrößerung. Die Quantifizierung von neutrophilen

Granulozyten im Lebergewebe wurde an 20 Aufnahmen pro Präparat in 400facher Vergrößerung durchgeführt.

2.2.7 Hämatologische Analyse

Intrakardiales Blut wurde zunächst in ein 1 mL EDTA-Reaktionsgefäß überführt und gut vermischt um Koagulation zu vermeiden. Die Proben wurden am Heinrich-Pette-Institut (Hamburg), in der Arbeitsgruppe von Dr. Carol Stocking mit Hilfe des Hämatologie-Analyse-Gerätes Hemavet 950 FS untersucht. Die Analyse gab Aufschluss über die Anzahl verschiedener Zellpopulationen wie verschiedene Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten im untersuchten Blut.

2.2.8 Durchflusszytometrie

Im Durchflusszytometer werden Zellen anhand ihrer Größe, Granularität, intrazellulären Zusammensetzung und Oberflächenbeschaffenheit untersucht. Für die Analyse werden die Zellen in einem laminaren Probenstrom einzeln an Lasern („light amplification by stimulated emission of radiation“- „Lichtverstärkung durch angeregte Emission von Strahlung“) vorbeigeleitet. Das Licht der einzelnen Laser wird durch die Erfassung der Zellen gestreut und gibt so Auskunft über Größe (Vorwärtsstreulicht – „Forwardscatter“, FSC) und Granularität (Seitwärtsstreulicht – „Sidescatter“, SSC) der einzelnen Zellen.

Zusätzlich können die Zellen mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern markiert werden, um so Aussagen über die vorhandenen Proteine machen und die Zellen näher charakterisieren zu können. Die Fluorochrome werden durch das monochromatische Licht der Laser angeregt und emittieren Fluoreszenzlicht höherer Wellenlänge. Dieses emittierte Licht wird von verschiedenen Linsen des Durchflusszytometers gesammelt, von Spiegeln geteilt und von bestimmten optischen Filtern des Geräts gefiltert, die möglichst viel Licht einer einzelnen Fluoreszenz durchlassen, während andere herausgefiltert werden. Das ankommende Licht wird von Detektoren erfasst und somit können die einzelnen Parameter der Messung ermittelt werden.

Um die Bindungs-Spezifität der verwendeten Antikörper zu überprüfen, wurden Zellen mit Istotyp-Kontrollen markiert und untersucht. Diese Spezifitätskontrollen sind Fluoreszenz-markierte Antikörper des gleichen Isotyps, die aber keine spezifischen Antigen-bindenden-Eigenschaften besitzen¹⁰⁵.

2.2.8.1 Oberflächenfärbung von Leber-Lymphozyten

Nach Sakrifizierung der Tiere mittels CO₂ – Intoxikation wurde das Bauchfell abpräpariert und die Leber entnommen. Ein Stück der Leber wurde abgetrennt und in einem 15 mL Reaktionsgefäß in 5 mL DMEM Zellkulturmedium mit 10 % FCS bis zur Weiterverarbeitung inkubiert.

Das Lebergewebe wurde anschließend mit Hilfe des Gummistempels einer sterilen Spritze durch ein 70 µm Zellsieb gerieben. Das Sieb wurde zwischendurch mit kaltem 1 x PBS 1 % FCS gespült und das gesamte Homogenat wurde in ein 50 mL Reaktionsgefäß auf Eis aufgefangen. Nachdem das Zellsieb komplett leer war, wurde das Reaktionsgefäß mit dem Homogenat mit kaltem 1 x PBS 1 % FCS aufgefüllt und für 10 min bei 394 xg und 4 °C zentrifugiert.

Während der Zentrifugation wurde der Percoll™-Gradient vorbereitet. Hierfür wurden bei RT eine 90 %ige Percoll™-Lösung mit 10 x PBS und daraus eine 40 %ige Percoll™-Lösung mit 1 x PBS vorbereitet. Je Leberprobe wurden in ein 15 mL Reaktionsgefäß 4 mL der 90 %igen Percoll™-Lösung vorgelegt. Nach der Zentrifugation des Leberhomogenates wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit Hilfe einer 10 mL serologischen Pipette in 4 mL der 40 %igen Percoll™-Lösung resuspendiert und anschließend vorsichtig auf die vorbereiteten 4 mL der 90 %igen Percoll™-Lösung geschichtet. Die Proben wurden für 20 min bei RT und 540 xg ohne Bremse zentrifugiert. Die entstandene Interphase in der sich die Lymphozyten befinden wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues 50 mL Reaktionsgefäß überführt, mit 1 x PBS 1 % FCS auf 50 mL aufgefüllt und für 10 min bei 4 °C und 394 xg zentrifugiert. Um die in der Probe vorhandenen Erythrozyten zu lysieren wurde das Pellet in 3 mL Erythrozyten-Lysis-Puffer resuspendiert und für 7 min auf Eis inkubiert. Das Stoppen der Reaktion wurde durch das Auffüllen des Reaktionsgefäßes mit kaltem 1 x PBS 1 % FCS erreicht. Um den Erythrozyten-Lysis-Puffer zu entfernen, wurde die Probe erneut für 5 min bei 4 °C und 400 xg zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet wurde in 1 mL kaltem 1 x PBS 1 % FCS resuspendiert und die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt (2.2.9).

Die gewünschte Anzahl an Zellen wurde durch ein 30 µm Zellsieb in ein 5 mL Reaktionsgefäß in einem Gesamtvolumen von 100 µL überführt. Die Probe wurde stets auf Eis gehalten. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden durch eine 10minütige Inkubation mit einem Fc-Block (1:200) abgesättigt.

Anschließend wurde als Vitalitätstest der Fluoreszenzfarbstoff DAPI in Endkonzentration 1:200 dazugegeben. DAPI lagert sich an Nukleinsäuren an und wird somit als Zellkernmarker in der Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Da dieser Farbstoff allerdings nur sehr langsam die Membran intakter Zellen passieren kann, durchdringt er zuvor tote Zellen, lagert sich an die Nukleinsäuren im Zellkern an und kann somit als Vitalitätsmarker verwendet werden. Nach 15minütiger Inkubation bei 4 °C im Dunkeln, wurde je Probe 1 mL kaltes 1 x PBS 1 % FCS hinzugefügt, die Probe wurde für 5 min

bei 4 °C und 400 xg zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in je 100 µL 1 x PBS 1 % FCS resuspendiert und mit dem Antikörpercocktail für 20 min im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit je 1 mL 1 x PBS 1 % FCS gewaschen und für 5 min bei 4 °C und 400 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in je 200 µL kaltem 1 x PBS 1 % FCS resuspendiert und auf Eis im Dunkeln bis zur Messung am Durchflusszytometer gelagert.

2.2.8.2 Oberflächenfärbung von Milz-Lymphozyten

Nach Sakrifizierung des Tieres mittels CO₂-Intoxikation wurde das Bauchfell abpräpariert, die Milz entnommen und bis zur Weiterverarbeitung in einem 15 mL Reaktionsgefäß mit 5 mL DMEM (10 % FCS) Zellkulturmedium gelagert.

Die Milz wurde mit der Schere in 4-5 Stücke geschnitten und mit Hilfe des Gummistempels einer sterilen Spritze durch ein 70 µm Zellsieb gerieben. Das Sieb wurde mit kaltem 1 x PBS 1 % FCS gespült und der Durchfluss wurde zusammen mit der Milzzellsuspension in ein 50 mL Reaktionsgefäß auf Eis aufgefangen. Anschließend wurde das 50 mL Reaktionsgefäß auf 20 mL mit kaltem 1 x PBS 1 % FCS aufgefüllt und für 5 min bei 4 °C und 400 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen, das Pellet in 200 µL kaltem 1 x PBS 1 % FCS resuspendiert und durch ein 30 µm Zellsieb in ein 5 mL Reaktionsgefäß überführt. Um die in der Zellsuspension vorhandenen Erythrozyten zu lysieren wurde je Probe 3 mL Erythrozyten-Lysis-Puffer hinzugefügt und die Probe wurde für 7 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 5 min bei 4 °C und 400 xg zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 1 mL kaltem 1 x PBS 1 % FCS resuspendiert und die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt (2.2.9).

Die gewünschte Anzahl an Zellen wurde durch ein 30 µm Zellsieb in ein 5 mL Reaktionsgefäß in einem Gesamtvolumen von 100 µL überführt. Die Probe wurde stets auf Eis gehalten. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden durch eine 10minütige Inkubation mit einem Fc-Block (1:200) abgesättigt. Anschließend wurde die Probe wie bereits unter 2.2.8.1 beschrieben mit DAPI als Viabilitätsmarker und verschiedenen Fluoreszenzgekoppelten-Antikörper gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

2.2.8.3 Oberflächenfärbung von blutresidenten Lymphozyten

Das Tier wurde mittels CO₂-Intoxikation sakrifiziert, der Brustkorb wurde geöffnet, das intrakardiale Blut entnommen und, um die Koagulation zu verhindern in ein EDTA-Reaktionsgefäß überführt. Je 200 µL Blut wurden aus dem EDTA-Röhrchen in ein 5 mL Reaktionsgefäß überführt, mit 3 mL Erythrozyten-Lysis-Puffer vermischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Lyse wurden die Proben für 5 min bei 4°C und 400 xg zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 200 µL kaltem 1 x PBS 1 % FCS resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt (2.2.9).

Die gewünschte Anzahl an Zellen wurde durch ein 30 µm Zellsieb in ein 5 mL Reaktionsgefäß in einem Gesamtvolumen von 100 µL überführt. Die Probe wurde stets auf Eis gehalten. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden durch eine 10minütige Inkubation mit einem Fc-Block (1:200) abgesättigt. Anschließend wurde die Probe wie bereits unter 2.2.8.1 beschrieben mit DAPI als Viabilitätsmarker und verschiedenen Fluoreszenzgekoppelten-Antikörper gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

2.2.9 Zellzahlbestimmung

Für die Zellzahlbestimmung wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Die Zählfläche der Neubauer-Zählkammer ist durch optische Begrenzungen in Quadrate eingeteilt. Durch den Abstand zwischen Zählfläche und Deckglas entsteht ein Raum mit definiertem Volumen, in dem sich die verdünnte Zellsuspension befindet. Um zusätzlich die Vitalität der Zellen zu bestimmen, wurde die Zellsuspension mit Trypanblau angefärbt. Dieser Farbstoff wird von der intakten Zellmembran abgehalten, sodass es nur an zytosolische Proteine toter Zellen binden kann und diese somit blau erscheinen lässt.

Die Bestimmung der Zellzahl wurde durch das Auszählen vierer Großquadrate bestimmt. Die Zellkonzentration wurde mit folgender Formel ausgerechnet:

$$c \text{ [Zellen/mL]} = \text{Mittelwert der ausgezählten Großquadrate} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4$$

Der Multiplikator 10^4 ergibt sich aus der definierten Zählfläche und dem Volumen der Zählkammer.

2.2.10 Untersuchungen auf RNA Ebene

Lebergewebe, wie in 2.2.3 beschrieben nach Versuchsende entnommen und verarbeitet, wurde hinsichtlich der Expression verschiedener Gene auf mRNA-Ebene untersucht.

2.2.10.1 RNA-Isolation aus Lebergewebe

Die RNA-Isolation aus Gewebe erfolgte mittels TriFast (peqGOLD TriFast™FL, 2.1.9). Dieses Reagenz ermöglicht es, aus einer Probe RNA, DNA und Proteine zu isolieren. Um die RNA aus Lebergewebe zu isolieren wurden die auf -80 °C gelagerten Gewebeproben auf Trockeneis überführt. Die Proben wurden nacheinander bei RT unter Verwendung RNase-freien Reagenzien und Verbrauchsmaterialien verarbeitet.

Je Probe wurden 500 µL TriFast hinzugefügt und das Gewebestück wurde mit Hilfe eines Mikropistils homogenisiert. Anschließend wurden erneut je 500 µL TriFast hinzugefügt und die Proben für ca. 10 s gemixt. Bei diesem Schritt wird das in das TriFast-Reagenz enthaltene Guanidinisothiocyanat das Gewebe lysiert und gleichzeitig RNasen inaktiviert. Um das so entstandene Homogenat zu trennen wurde zunächst zu jeder Probe 200 µL Chloroform hinzugegeben. Die Gewebeproben wurden für je 30 s gemixt, für 2-3 min bei RT inkubiert und anschließend bei 12000 rpm und 4 °C für 10 min in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Nach der Zentrifugation haben sich drei Phasen gebildet: in der oberen Phase ist RNA, in dem mittleren weißen Ring DNA und in der unteren Phase sind Proteine enthalten. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Je Probe wurden 500 µL eiskaltes Isopropanol hinzugefügt und die Probe wurde invertiert. Das Präzipitieren der RNA erfolgte über Nacht bei -20 °C. Am nächsten Tag wurden die RNA-Proben bei 4 °C und 12000 rpm in der Tischzentrifuge für 30 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das RNA-Pellet in je 700 µL 70 %igem Ethanol gewaschen und für 10 min bei 15000 rpm und 4 °C in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet getrocknet. Anschließend wurde das RNA-Pellet auf Eis in je 50 µL DEPC-Ultra Pure Wasser (2.1.9) resolubilisiert. Um das RNA-Pellet komplett zu lösen, wurden die Proben für 5 min im Heizblock bei 55 °C inkubiert und anschließend sofort auf Eis überführt. Der RNA-Gehalt wurde photometrisch bestimmt (2.2.10.2) und anschließend wurde cDNA synthetisiert (2.2.10.3). Die restliche RNA wurde bei -80 °C gelagert.

2.2.10.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der wie unter 2.2.10.1 beschrieben gewonnenen RNA wurde mit Hilfe des NanoDrop 2000 bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen ddH₂O als Referenzwert photometrisch bestimmt.

Die RNA-Konzentration wurde mit folgender Formel ausgerechnet:

$$c[\mu\text{g}/\text{mL}] = \text{OD}_{260} * V * F$$

wobei V für Verdünnungsfaktor und F für Multiplikationsfaktor steht. Für RNA ist der Multiplikationsfaktor 40.

Zusätzliche Informationen über die Reinheit der RNA gibt das Verhältnis $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$, wobei eine Wellenlänge von 260 nm dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren und eine Wellenlänge von 280 nm dem Absorptionsmaximum der Proteine entspricht. Bei einer guten Reinigung liegt der Quotient zwischen 1,8 und 2,2.

2.2.10.3 cDNA-Synthese

Für die Umschreibung von RNA in cDNA wurde das „High-Capacity cDNA Reverse Transcription“ Kit von Applied Biosystems nach Angaben des Herstellers verwendet. Pro Probe wurde 1 µg RNA verwendet. Der Ansatz für eine Reaktion setzte sich folgendermaßen zusammen:

10 x RT Puffer	2	µL
25 x dNTP Mix (100 mM)	0,8	µL
10 x RT Random Primers	2	µL
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1	µL
Nukleasen freies H ₂ O	4,2	µL
RNA	1	µg

Folgendes Programm wurde für die cDNA Synthese verwendet:

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur [°C]	25	37	85	7
Zeit [min]	10	120	5	∞

2.2.10.4 Quantitative real time PCR (qRT-PCR)

RNA-Expressionsanalysen wurden nach erfolgter cDNA-Synthese (2.2.10.3) im Sonden basierten System mittels quantitativer real-time PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Die verwendeten TaqMan[®]-Gene Expression Assays basieren auf einem unmarkierten Primer-Paar, das der Amplifikation der cDNA dient und auf einer an die cDNA bindenden Sonde, die an einem Ende ein Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und an dem anderen Ende einen sogenannten Quencher besitzt. Durch den Quencher wird die Fluoreszenzemission des Reporter-Fluoreszenzfarbstoffes unterdrückt. Im Elongationsschritt der PCR, nachdem die TaqMan[™]-Sonde an den komplementären DNA-Strang gebunden hat, wird diese durch die Taq-Polymerase degradiert und somit der Reporter-Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt. Die Fluoreszenzemission kann somit nicht mehr durch den Quencher unterdrückt werden und es entsteht ein Fluoreszenzsignal der in Echtzeit gemessen wird. Je mehr PCR-Produkte entstehen, desto höher ist das Fluoreszenzsignal, das somit die Quantifizierung ermöglicht.

Die qRT-PCR erfolgte in 96 well Mikrotiterplatten („MicroAmp[®] Fast Optical 96-well Reaction Plate“, Applied Biosystems by life technologies GmbH, Darmstadt) in einem Real Time StepOnePlus[™] System (Applied Biosystems by life technologies GmbH, Darmstadt).

Ein Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

KAPA [™] Probe Fast MasterMix Universal, peqlab Biotechnologies	5	μL
TaqMan [®] -Gene Expression Assay, Applied biosystems	0,5	μL
ROX Reference Dye High, peqlab Biotechnologies	0,2	μL
RNase freies Wasser	3,3	μL
cDNA	1	μL

Jede Probe wurde in Duplikaten analysiert. Als Referenzgen für die relative Quantifizierung wurde GAPDH verwendet Die Daten wurden mit der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode ausgewertet und die relative Expression im Vergleich zu der Kontrollgruppe, die gleich 1 gesetzt wurde, mit der Formel $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ ausgerechnet.

Folgendes Programm wurde zur Amplifizierung verwendet:

Initiale Denaturierung	95 °C	0:20 min	
Denaturierung	95 °C	0:01 min	X 40
Annealing/Elongation	60 °C	0:20 min	

3 Ergebnisse

3.1 Die Rolle von Todesrezeptoren im Concanavalin A Modell der experimentellen Hepatitis

In verschiedenen Publikationen wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Leberschaden im ConA Modell durch die Bindung von Liganden an die Todesrezeptoren der Parenchymzellen, vor allem der Hepatozyten, mediiert wird^{45,77,80,81}. Ebenfalls ist für dieses Modell bekannt, dass der Todesrezeptor TNFR1 und dessen Ligand TNF essentiell sind, da Tiere, die entweder einen kompletten TNFR1 oder einen kompletten TNF Knock-Out haben vor Leberschädigung geschützt sind^{77,78}.

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des TNF/TNFR Signalwegs in Modellen der Hepatitis. Hierzu wurden zellspezifische Knock-Out Mauslinien verwendet, in denen der TNFR1 jeweils in einem bestimmten Gewebe bzw. in einer Zellsorte deletiert wurde.

3.1.1 Leberparenchym-spezifisches FADD ist entbehrlich in der ConA-vermittelten Leberentzündung

Die Hypothese, dass die Bindung von TNF an TNFR1 der Hepatozyten im ConA Modell FADD mediiert zur Apoptose führt, wurde in Experimenten, die an der Universität Köln von Dr. med. Hanno Ehlen durchgeführt wurden, überprüft. Die Auswertung dieser Experimente erfolgte am UKE Hamburg. In diesem Experiment wurden Tiere, die einen konditionellen Knock-Out von FADD spezifisch in Zellen des Leberparenchyms besitzen (FADD^{LPC-KO}), mit ConA i.v. behandelt (2.2.1). Die FADD^{FL} Geschwistertiere, die keinen FADD Knock-Out aufweisen, wurden als Kontrolle mit der gleichen Dosis ConA behandelt. Als weitere Kontrolle wurden Tiere mit systemischem TNFR1 Knock-Out (TNFR1^{-/-}) im selben Experiment untersucht.

In Abbildung 4 sind die Ergebnisse der Serum Transaminasen Messung dieser Untersuchungen zusammengefasst.

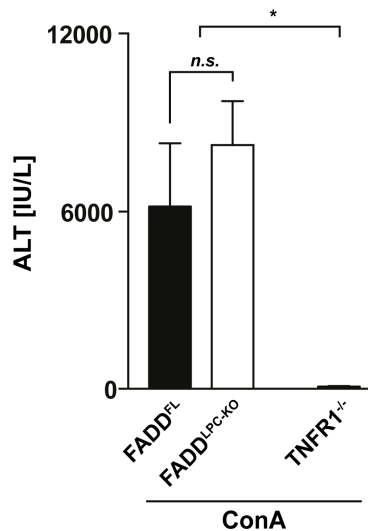


Abb. 4: Serum-ALT-Messung von 8 h mit ConA behandelten FADD^{FL}, FADD^{LPC-KO} und TNFR1^{-/-} Tieren. Angaben +/- SEM. n = 12; 9; 5; n.s. = statistisch nicht signifikant; * = p < 0,05

Die TNFR1^{-/-} Tiere zeigten, wie erwartet, keine erhöhten Serum-Transaminasen nach ConA-Behandlung. Überraschenderweise konnte in Folge der Behandlung in FADD^{LPC-KO} Tieren, ebenso ein Anstieg der Transaminasen wie in FADD^{FL} Kontrolltieren gemessen werden (Abb. 4). Der Mittelwert der ALT Messung der FADD^{FL} Tiere betrug 6000 IU/L während bei den FADD^{LPC-KO} Tieren im Mittel ein ALT Wert von 8000 IU/L gemessen werden konnte (Abb. 4).

Dieses Ergebnis ließ sich histologisch bestätigen. Leberpräparate der behandelten Tiere wurden mittels H&E gefärbt (2.2.6.2) und mikroskopisch analysiert. Die prozentuelle geschädigte Leberfläche wurde mit Hilfe des Programms ImageJ ausgerechnet. Abbildung 5 zeigt repräsentative Fotos der untersuchten Präparate. Ebenfalls wird die histologische Analyse graphisch dargestellt.

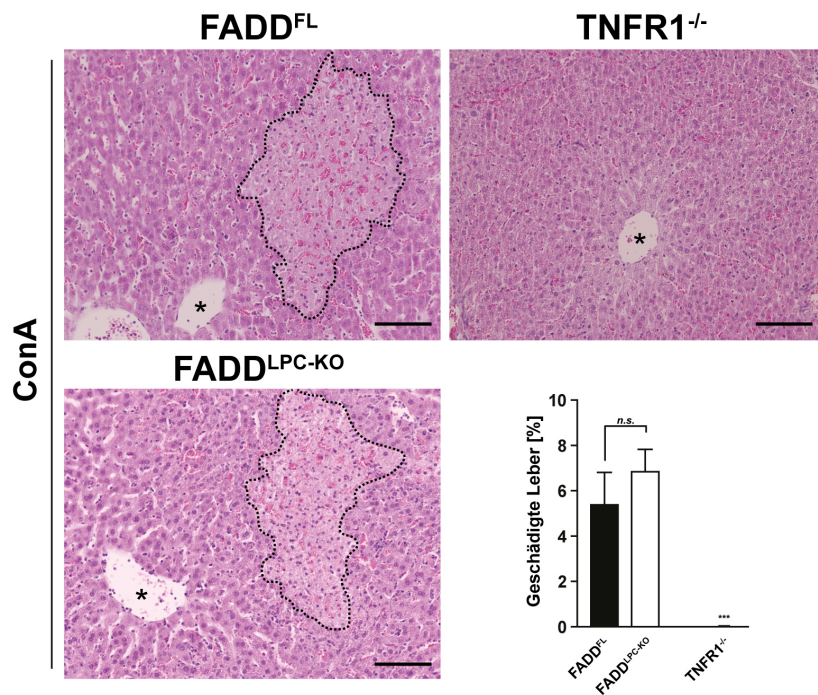


Abb. 5: Histologische Analyse der H&E gefärbten Leberpräparate der mit ConA behandelten FADD^{FL}, FADD^{LPC-KO} und TNFR1^{-/-} Tiere.

Repräsentative mikroskopische Aufnahmen. * = Zentralvene. Balken = 50 µm.

Markierung umrandet die geschädigte Fläche.

Statistische Auswertung der histologischen Analyse: Dargestellt ist die geschädigte Leberfläche in Prozent +/- SEM. n.s. = statistisch nicht signifikant. *** = p < 0,001.

Die H&E gefärbten Leberpräparate untersuchter FADD^{FL} und FADD^{LPC-KO} Tiere zeigten vermehrt verblasste Areale mit diffuser Kern- und Zellmorphologie der Hepatozyten, sowie deutlichen Zellinfiltraten. Diese Areale, die keine normale Morphologie des Leberparenchyms aufwiesen und bei denen keine klaren Zellstrukturen und Zellgrenzen der Hepatozyten erkannt werden konnten, wurden als geschädigte Areale identifiziert (Abb. 5, gestrichelte Markierung).

Die statistische Auswertung der gemessenen geschädigten Areale der FADD^{FL} Tiere ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen der FADD^{FL} und der FADD^{LPC-KO} Tiere: Im Mittel waren zum Zeitpunkt 8 h nach ConA-Injektion bei den FADD^{FL} Tieren ca. 5 % und bei den FADD^{LPC-KO} Tieren ca. 7 % der Leberfläche geschädigt (Abb. 5). Die TNFR1^{-/-} Tiere zeigten in Folge der ConA-Behandlung keine geschädigten Areale in der Leber (Abb. 5).

Überraschenderweise zeigten die FADD^{LPC-KO} Tiere in Folge der ConA-Behandlung sowohl erhöhte ALT-Werte, als auch geschädigte Leberareale. Es konnte in beiden Untersuchungen kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den FADD^{FL} und den FADD^{LPC-KO} Tieren beobachtet werden. Es ist somit davon auszugehen, dass der konditionelle FADD Knock-Out auf den Zellen des Leberparenchyms keinen Schutz vor Leberschaden im ConA Modell vermittelt.

Diese Ergebnisse beweisen, dass die durch TNF induzierte Leberschädigung im ConA Modell zwar TNFR1-abhängig ist, jedoch findet diese Schädigung nicht abhängig von FADD auf dem Leberparenchym statt.

Aus diesen Experimenten ergaben sich folgende Möglichkeiten für den TNF/TNFR1 Signalweg:

1. Die Leberschädigung erfolgt Parenchym-abhängig aber FADD-unabhängig oder
2. Der Schaden entsteht nicht durch die Bindung von TNF an den TNFR1 auf den Hepatozyten sondern auf anderen Zellen.

Um diese Hypothesen zu überprüfen, wurden konditionelle Knock-Out Mäuse generiert, die zellspezifische TNFR1 Deletionen aufweisen.

3.1.2 Generierung und Charakterisierung der TNFR1^{LPC-KO} Tiere

Um die Rolle des Parenchym-spezifischen TNFR1 *in vivo* untersuchen zu können, wurden Tiere generiert, die auf der Zelloberfläche der Hepatozyten und Cholangiozyten keinen TNFR1 exprimieren, während bei allen anderen Zellen des Organismus die TNFR1-Expression nicht beeinflusst wird. Dies wurde mit dem Cre/LoxP-System (1.6) erreicht. Tiere, mit von der Cre-Erkennungssequenz LoxP flankiertem TNFR1-Gen (TNFR1^{FL})¹⁰⁰ wurden mit Tieren verpaart, die die Cre-Rekombinase heterozygot unter dem Einfluss des Albumin Promoters und Enhancers und des AFP (α -Fetoprotein) Enhancers exprimieren. Diese Tiere weisen eine gezielte Deletion des TNFR1-Gens auf den Cholangiozyten und Hepatozyten auf¹⁰¹. Die aus dieser Verpaarung entstandenen Nachkommen teilen sich in zwei Gruppen auf: Tiere, die zwar das von LoxP-Sequenzen flankierte TNFR1-Gen besitzen aber keine AFP Cre Expression und somit auch keine Deletion des Rezeptors aufweisen (TNFR1^{FL}) und Tiere, die zusätzlich zu dem von LoxP-Sequenzen flankierten TNFR1-Gen auch die AFP Cre exprimieren und somit keinen TNFR1 auf den Zellen des Leberparenchyms, den Hepatozyten und Cholangiozyten, aufweisen (TNFR1^{LPC-KO}). Die Deletionseffizienz in der Leber für TNFR1^{FL}; AFP Cre transgene Tiere wurde bereits beschrieben⁵².

Um den transgenen Status der Tiere zu überprüfen, wurde jedes Tier mittels PCR genotypisiert (2.2.2). Um sicher zu stellen, dass die TNFR1^{LPC-KO} Tiere durch die spezifische Deletion des TNFR1 Gens auf Hepatozyten und Cholangiozyten *per se* keine Entzündung der Leber haben, wurde die Serum-ALT junger und alter TNFR1^{FL} und TNFR1^{LPC-KO} Tiere gemessen (2.2.4).

In Abbildung 6 ist zu erkennen, dass die ALT-Werte junger Tiere nicht erhöht sind und, dass kein signifikanter Unterschied zwischen ALT-Werten der TNFR1^{FL} und der TNFR1^{LPC-KO} Tieren besteht.

Auch histologisch unterschied sich die Leber der $TNFR1^{LPC-KO}$ Tiere nicht von der der $TNFR1^{FL}$ Tiere. Die Lebern wurden wie unter 2.2.3 beschrieben entnommen und verarbeitet. Es wurden am Mikrotom dünne Schnitte der Organe gemacht (2.2.6.1), die anschließend einer H&E Färbung (2.2.6.2) unterzogen, mikroskopisch begutachtet und zu Dokumentationszwecken fotografiert wurden. Abbildung 6 zeigt zusätzlich repräsentative Bilder von Lebern junger Tiere beider Genotypen.

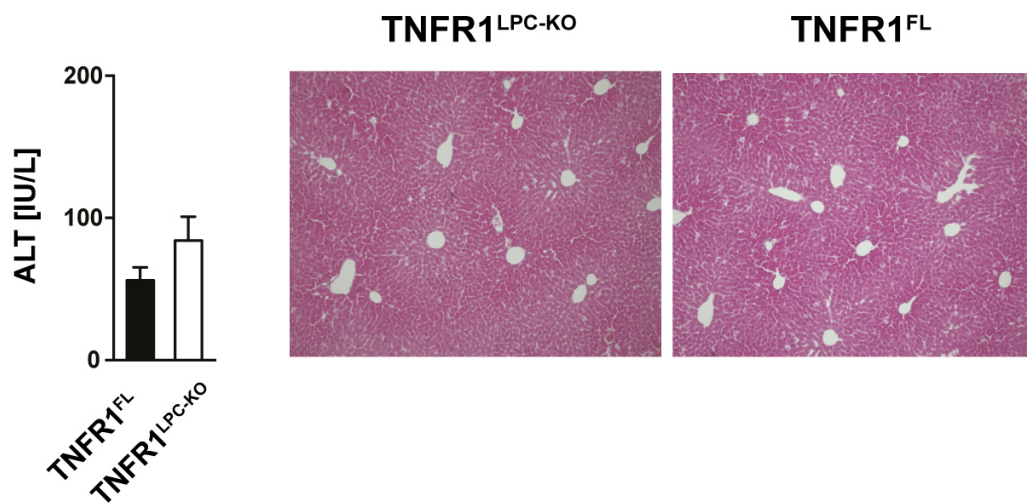


Abb. 6: Serum-ALT-Messung von unbehandelten jungen $TNFR1^{LPC-KO}$ und $TNFR1^{FL}$ Tieren. Angaben +/- SEM. n = 2-6.
Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von H&E gefärbten Lebern der $TNFR1^{LPC-KO}$ und $TNFR1^{FL}$ Tiere.

Dies konnte auch für die alten Tiere beider Genotypen bestätigt werden. Es konnten in Folge der Untersuchungen weder erhöhte ALT-Werte noch histologische Auffälligkeiten festgestellt werden (Abb. 7).

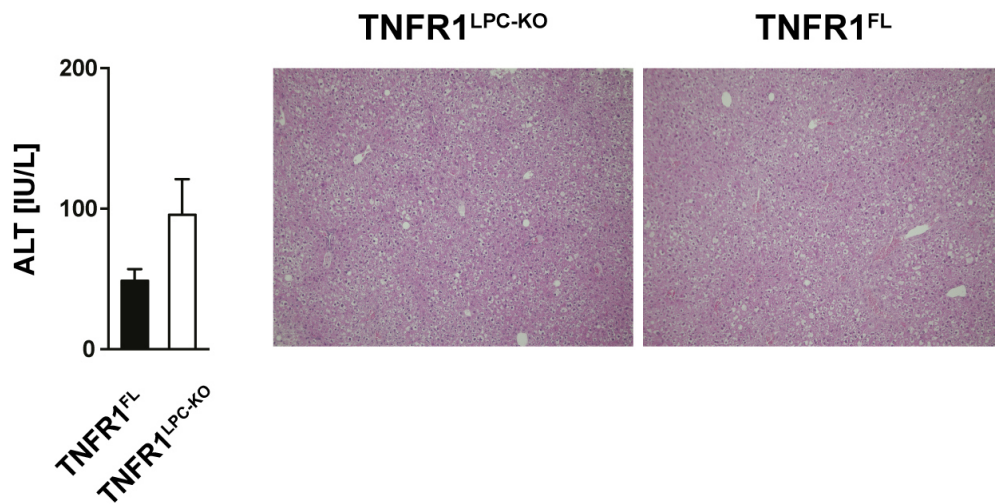


Abb. 7: Serum-ALT-Messung von unbehandelten alten TNFR1^{LPC-KO} und TNFR1^{FL} Tieren. Angaben +/- SEM. n = 2-6. Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von H&E gefärbten Lebern der TNFR1^{LPC-KO} und TNFR1^{FL} Tiere.

Weder junge noch alte TNFR1^{FL} oder TNFR1^{LPC-KO} Tiere entwickelten Tumore in der Leber oder in anderen Organen. Die Tiere waren phänotypisch mit gleichaltrigen C57BL/6J Wildtyp-Tieren vollkommen vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

3.1.3 Leberparenchym spezifischer TNFR1 ist im ConA Modell der Leberentzündung entbehrlich

Um die Funktion des auf Leberparenchym exprimierten TNFR1 im immunvermittelten ConA-induzierten Modell des akuten Leberversagens zu untersuchen, wurden sowohl TNFR1^{LPC-KO} Tiere als auch deren TNFR1^{FL} Geschwisterkontrollen gewichtsadaptiert für 8 h mit ConA oder PBS behandelt (2.2.1). Blut, Leber und Milz wurden für weitere Untersuchungen wie unter 2.2.3 beschrieben entnommen. Nach der Serumgewinnung folgte die Messung der ALT (2.2.4). Abbildung 8 zeigt die aus mehreren Experimenten gewonnenen Ergebnisse der ALT-Messung.

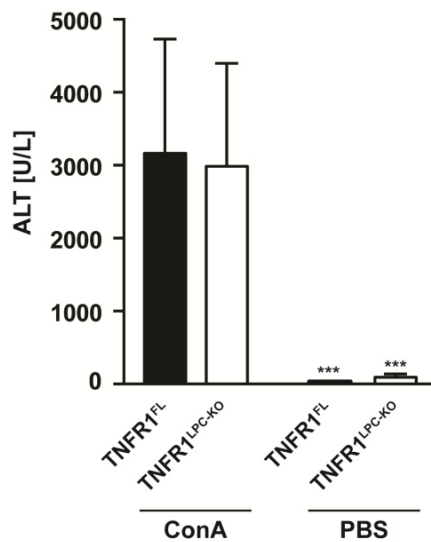


Abb. 8: Serum-ALT-Messung 8 h nach Injektion von ConA oder PBS in TNFR1^{FL} und TNFR1^{LPC-KO} Tieren. Der Graph zeigt zusammengefasste Ergebnisse aus mehreren unabhängigen Experimenten. Angaben +/- SEM. n= 14; 12; 5; 5. *** = p < 0,001.

Die TNFR1^{LPC-KO} Tiere zeigen mit einem ALT-Mittel von ca. 3000 IU/L massive Entzündung und somit keinen Schutz im ConA Modell. Die Höhe der ALT-Werte unterscheidet sich nicht signifikant von der der TNFR1^{FL} Tiere (Abb. 8) und verdeutlicht damit, dass die Deletion des TNFR1 Gens auf Hepatozyten und Cholangiozyten keinen Unterschied in diesem Modell ausmacht. Die PBS-behandelten Tiere zeigen, wie erwartet, keine erhöhten ALT-Werte.

Dieses Ergebnis ließ sich histologisch in der Leber bestätigen. Abbildung 9 zeigt repräsentative Bilder der Leber von mit ConA oder PBS behandelten TNFR1^{FL} und TNFR1^{LPC-KO} Tieren. Bei den ConA-behandelten Tieren sind, unabhängig vom Genotyp, viele Bereiche in der Leber erkennbar, die geschädigt sind und somit auf eine Leberentzündung hindeuten. Die PBS-behandelten Tiere weisen auch histologisch keine Leberentzündung auf. Da bei diesen Tieren keine geschädigten Bereiche zu sehen sind, ist davon auszugehen, dass die Zerstörung des Lebergewebes bei den ConA-behandelten Tieren durch die Gabe von ConA zu Stande kommt (Abb. 9).

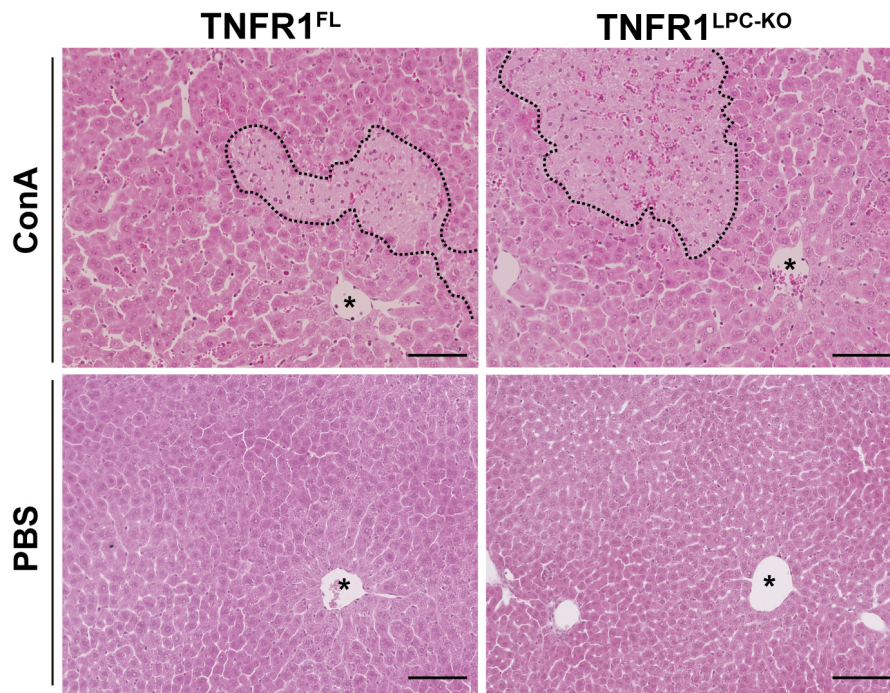


Abb. 9: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von H&E gefärbten Leberpräparaten 8 h nach ConA oder PBS Injektion in TNFR1^{FL} und TNFR1^{LPC-KO} Tieren.

* = Zentralvene. Balken = 50 µm.

Gestrichelte Linie umrandet die geschädigte Fläche.

Die prozentuelle Auswertung geschädigter Leberareale zeigte mit ca. 6 % keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den TNFR1^{FL} und TNFR1^{LPC-KO} Tieren (Abb. 10).

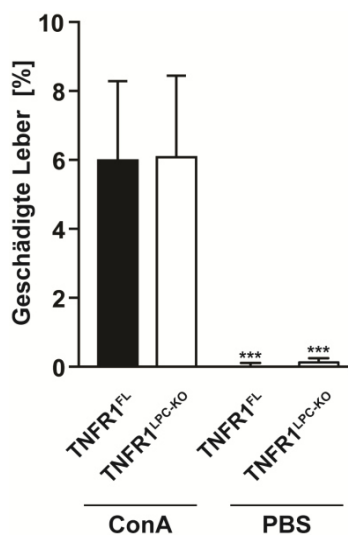


Abb. 10: Prozentuelle Auswertung geschädigter Leberareale 8 h nach Injektion von ConA oder PBS in TNFR1^{FL} und TNFR1^{LPC-KO} Tieren. Der Graph zeigt zusammengefasste Ergebnisse aus mehreren unabhängigen Experimenten.

Angaben +/- SEM. n = 14; 12; 5; 5. *** = p < 0,001.

Die Messung der Milzlänge zeigte, dass die ConA-induzierte Leberentzündung mit einer Vergrößerung der Milz einhergeht. Abbildung 11 zeigt die aus mehreren unabhängigen Experimenten zusammengefassten Daten. Die Milzlänge ist bei ConA-behandelten Tieren signifikant größer als bei PBS-behandelten Tieren. Jedoch ist zwischen den beiden ConA-behandelten Genotypen, auch in diesem Fall kein statistisch signifikanter Unterschied ersichtlich (Abb. 11).

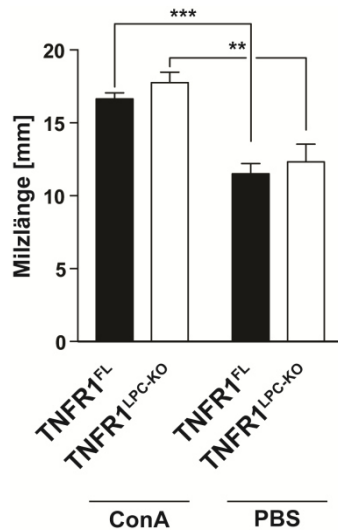


Abb. 11: Milzlänge ConA- und PBS- behandelter TNFR1^{FL} und TNFR1^{LPC-KO} Tiere. Der Graph zeigt zusammengefasste Ergebnisse aus mehreren unabhängigen Experimenten. Angaben +/- SEM. n= 14; 12; 5; 5. **= p < 0,01. *** = p < 0,001.

3.1.4 3DR^{LPC-KO} Tiere sind nicht vor ConA-induzierten Leberentzündung geschützt

Um die Rolle der weiteren Todesrezeptoren FAS und TRAILR auf Leberparenchym in diesem Modell zu untersuchen, wurden Tiere generiert, die die Cre-Rekombinase unter dem Einfluss des Albumin Promoters und Enhancers und des AFP (α -Fetoprotein) Enhancers exprimieren und zusätzlich zum TNFR1 auch die Rezeptoren FAS und TRAILR von der Erkennungssequenz flankiert haben. Den 3DR^{LPC-KO} Tieren⁵² fehlen die drei Todesrezeptoren auf den Hepatozyten und Cholangiozyten während alle anderen Gewebe von dieser Deletion unberührt bleiben.

Diese Tiere wurden analog der zuvor beschriebenen Experimente gewichtsadaptiert mit ConA behandelt (2.2.1). Die Messung der Serum ALT-Werte 8 h nach Behandlung zeigte keinen Unterschied in der Reaktion beider Genotypen (Abb. 12). Die unbehandelte Kontrollgruppe zeigte, wie erwartet, keine erhöhten Leberenzyme wobei die ConA-behandelten Tiere, unabhängig vom Genotyp, erhöhte Transaminasen aufwiesen.

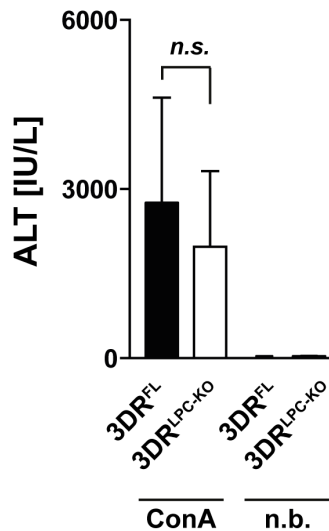


Abb. 12: Serum-ALT-Messung der 8 h mit ConA behandelten oder nicht behandelten 3DR^{FL} und 3DR^{LPC-KO} Tiere. Der Graph zeigt zusammengefasste Ergebnisse aus mehreren unabhängigen Experimenten. Angaben +/- SEM. n = 6; 12; 3; 2. n.s. = statistisch nicht signifikant. n.b. = nicht behandelt.

Die PBS-Kontrollen wiesen dagegen keine Entzündungen der Leber auf, was beweist, dass die gemessenen entzündeten Areale durch die Behandlung mit ConA entstanden sind (Abb. 12).

3.1.5 Generierung und Charakterisierung der TNFR1^{TC-KO} Linie

Da T-Zellen im ConA Modell eine entscheidende Funktion übernehmen⁷², sollte überprüft werden, welche Funktion der T-Zell spezifische TNFR1 in diesem Kontext hat.

Um die Bedeutung des TNFR1 auf T-Zellen in diesem Modell zu untersuchen, wurden Tiere generiert, die zusätzlich zu dem von der Cre Erkennungssequenz LoxP flankierten TNFR1-Gen auch die unter dem Einfluss des CD4-Promotors stehende Cre exprimieren.

Der transgene Status dieser Tiere wurde stets mittels PCR (2.2.2.2) untersucht.

Da alle CD8⁺ T-Zellen im Laufe ihrer Entwicklung CD4⁺ waren und die CD4 Cre in der embryonalen Phase bereits aktiv ist, sind diese Zellen ebenfalls von der TNFR1 Deletion betroffen. Somit ist in diesem Fall der TNFR1 auf CD4⁺, CD8⁺ - T-Zellen sowie NKT Zellen deletiert¹⁰². Um zu überprüfen, dass diese Tiere *per se* keine Leberentzündung aufweisen wurden junge und alte TNFR1^{TC-KO} Tiere und deren TNFR1^{FL} Geschwister als Kontrolle untersucht. Die ALT-Messung (2.2.4) ergab bei jungen Tieren, wie in Abbildung 13 zusammengefasst, keinen signifikanten Unterschied und keinen Hinweis auf eine Entzündung der Leber zwischen beiden Genotypen. Dieses Ergebnis ließ sich histologisch anhand H&E gefärbter (2.2.6.2) Leberpräparate bestätigen. Abbildung 13 zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Lebern von TNFR1^{FL} sowie TNFR1^{TC-KO} Tieren.

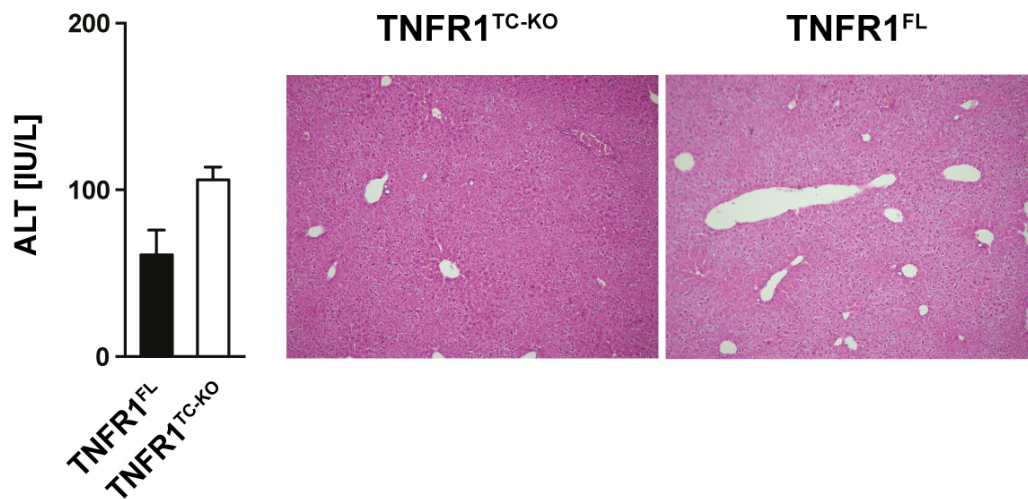


Abb. 13: Serum-ALT-Messung von unbehandelten jungen $TNFR1^{TC-KO}$ und $TNFR1^{FL}$ Tieren. Angaben +/- SEM. n = 2-6.
Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von H&E gefärbten Lebern der $TNFR1^{TC-KO}$ und $TNFR1^{FL}$ Tiere.

Die ALT-Untersuchung alter Tiere ergab, wie in Abbildung 14 zusammengefasst, ebenfalls keine signifikanten Unterschied zwischen den beiden Genotypen und auch keine Hinweise auf eine sich im Laufe der Zeit entwickelnde Leberentzündung.

Dieses Ergebnis ließ sich histologisch anhand H&E gefärbter (2.2.6.2) Leberpräparate bestätigen. Abbildung 14 zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Lebern von $TNFR1^{FL}$ sowie $TNFR1^{TC-KO}$ Tieren. Die histologische Untersuchung gab keine Hinweise auf eine Leberentzündung und zeigte keine geschädigten Areale.

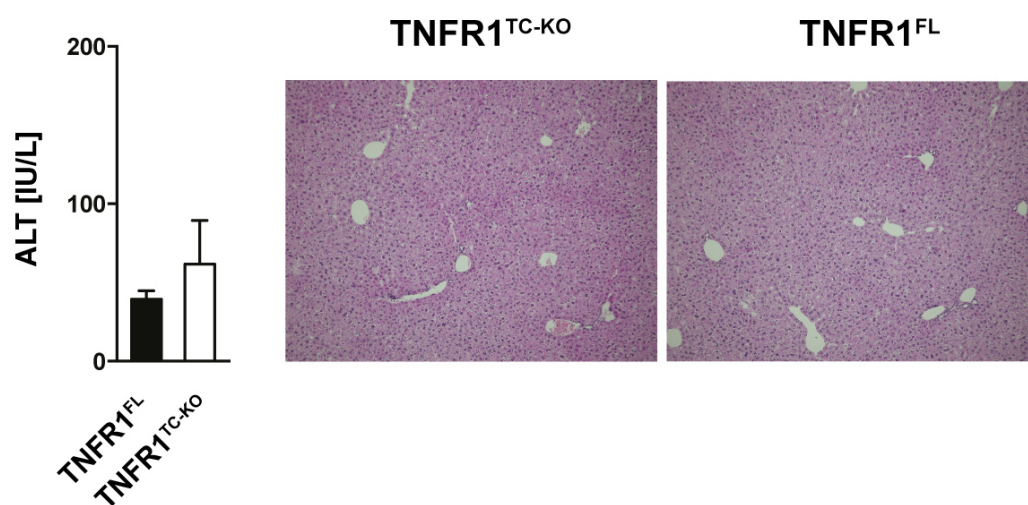


Abb. 14: Serum-ALT-Messung von unbehandelten alten $TNFR1^{TC-KO}$ und $TNFR1^{FL}$ Tieren. Angaben +/- SEM. n = 2-6.
Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von H&E gefärbten Lebern der $TNFR1^{TC-KO}$ und $TNFR1^{FL}$ Tiere.

3.1.6 TNFR1^{TC-KO} Tiere sind nicht vor ConA-induziertem Schaden geschützt

Um die Bedeutung des TNFR1 auf T-Zellen für das ConA Modell zu untersuchen, wurde TNFR1^{TC-KO} Tiere ConA injiziert (2.2.1). Die entsprechenden TNFR1^{FL} Geschwistertiere fungierten als Kontrolle. Nach Beenden des Experiments wurden Blut und Organe entnommen und weiterverarbeitet (2.2.3). Es fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied in den Mittelwerten der Serum-ALT 8 h nach ConA-Injektion. Im Mittel konnte bei den ConA-behandelten TNFR1^{FL} Tieren ein ALT-Wert von ca. 6000 IU/L und bei den TNFR1^{TC-KO} Tieren ein ALT-Mittel von ca. 4500 IU/L gemessen werden (Abb. 15). Die PBS-behandelten Tiere zeigten ALT-Werte innerhalb der Normgrenzen für gesunde Tiere. In Abbildung 15 werden die Ergebnisse der ALT-Untersuchungen zusammengefasst.

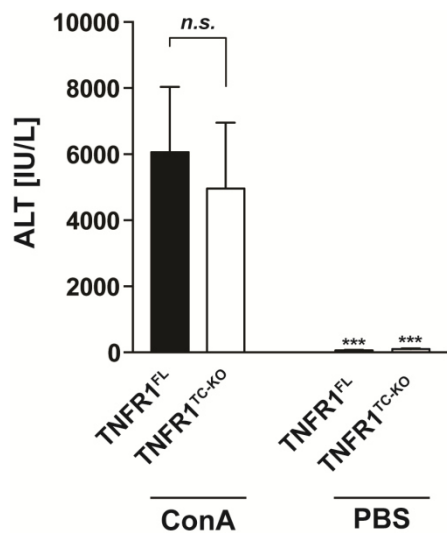


Abb. 15: Serum-ALT-Messung der 8 h mit ConA oder PBS behandelten TNFR1^{FL} und TNFR1^{TC-KO} Tiere. Der Graph zeigt zusammengefasste Ergebnisse aus mehreren unabhängigen Experimenten. Angaben +/- SEM. n = 15; 15; 2; 3. n.s. = statistisch nicht signifikant. *** = p < 0,001.

Dass das Fehlen des TNFR1 auf T-Zellen keinen Schutz vor ConA-vermittelter Leberentzündung vermittelt, wurde histologisch überprüft. Abbildung 16 zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen H&E gefärbter (2.2.6.2) Leberschnitte ConA- und PBS-behandelter TNFR1^{TC-KO} und TNFR1^{FL} Tiere.

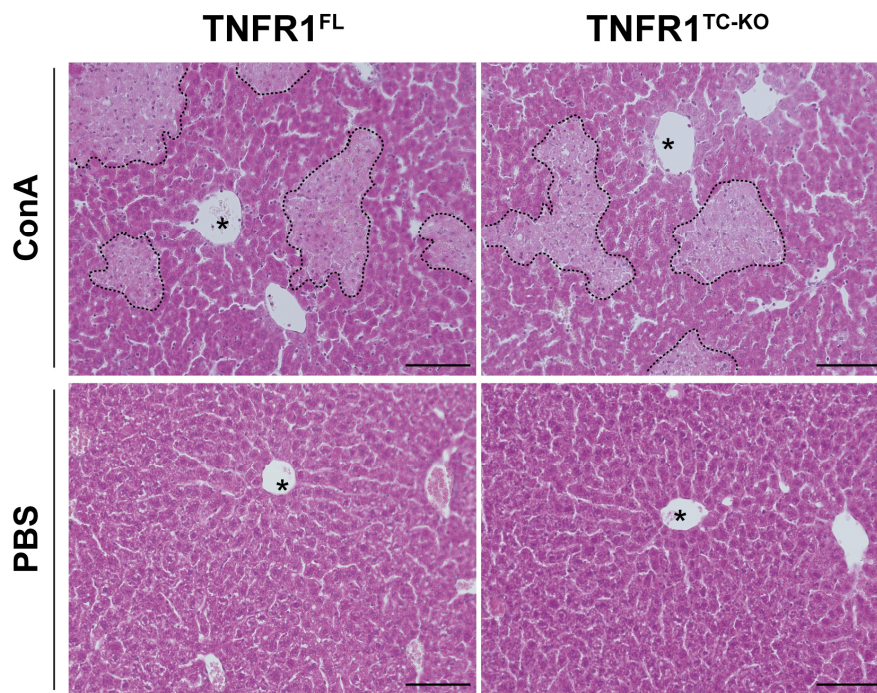


Abb. 16: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von H&E gefärbten Leberpräparaten 8 h nach ConA oder PBS Injektion in $TNFR1^{FL}$ und $TNFR1^{TC-KO}$ Tieren.

* = Zentralvene. Balken = 50 μ m.

Gestrichelte Linie markiert die geschädigte Fläche.

Die histologischen Untersuchungen ergaben geschädigte Areale der ConA-behandelten Lebern beider Genotypen. Die PBS-behandelten Tiere wiesen histologisch keine Entzündungsareale in der Leber auf.

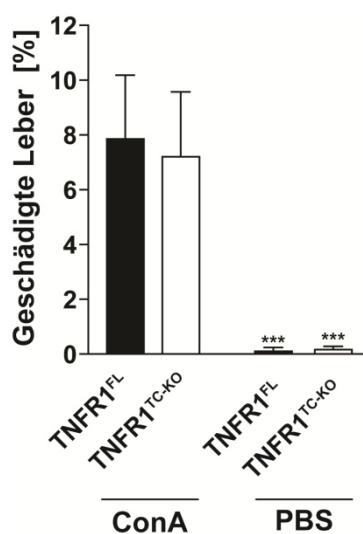


Abb. 17: Prozentuelle Auswertung geschädigter Leberareale 8 h nach Injektion von ConA oder PBS in $TNFR1^{FL}$ und $TNFR1^{TC-KO}$ Tieren. Der Graph zeigt zusammengefasste Ergebnisse aus mehreren unabhängigen Experimenten.

Angaben +/- SEM. n= 15; 15; 2; 3. *** = p < 0,001.

Die statistische Auswertung der Quantifizierung der geschädigten Leberfläche bestätigte die Ergebnisse der ALT-Messung. Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den

beiden behandelten Gruppen. Beide Gruppen wiesen nach ConA-Behandlung ca. 8 % (TNFR1^{FL}, Abb. 17), bzw. ca. 7,5 % (TNFR1^{LPC-KO}, Abb. 17) geschädigte Leberfläche auf. Die Untersuchung der PBS-behandelten Kontrolltiere zeigte signifikant weniger geschädigte Leberfläche in diesen Tieren (Abb. 17).

Die phänotypische Untersuchung der Milz zeigte, im Einklang mit vorherigen Ergebnissen, einen signifikanten Längenunterschied zwischen den Milzen der ConA- und PBS-behandelten Tieren, jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden ConA-behandelten Genotypen (Abb. 18).

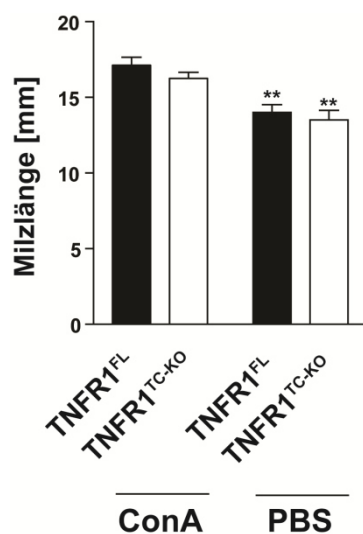


Abb. 18: Milzlänge von 8 h mit ConA oder PBS behandelte TNFR1^{FL} und TNFR1^{TC-KO} Tiere. Der Graph zeigt zusammengefasste Ergebnisse aus mehreren unabhängigen Experimenten. Angaben +/- SEM. n = 15; 15; 2; 3. **= p < 0,01.

Im Mittel wurde in der ConA-behandelten Gruppe eine Milzlänge von ca. 17 mm (TNFR1^{FL}) bzw. von ca. 16 mm (TNFR1^{TC-KO}) und in der PBS-behandelten Gruppe eine Milzlänge von ca. 14 mm (TNFR1^{FL}) bzw. von ca. 13 mm (TNFR1^{TC-KO}) gemessen (Abb. 18).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass das Fehlen des TNFR1 auf den T- und NKT-Zellen keinen Schutz vor Leberentzündung im ConA Modell mit sich bringt. Der auf T-Zellen und NKT-Zellen exprimierte TNFR1 scheint bei der Schädigung der Leber in diesem Modell keine essentielle Rolle zu spielen.

3.1.7 Generierung und Charakterisierung der TNFR1^{EC-KO} Tiere

Tiere, die eine Endothel-spezifische Deletion des TNFR1 haben, wurden durch Kreuzung der beiden Mauslinien TNFR1^{FL} und Cdh5 Cre generiert. Da der Cdh5-Promotor in allen Endothelzellen des Körpers exprimiert wird¹⁰³, weisen die so entstandenen Nachkommen entweder eine Deletion des

TNFR1 auf den Endothelzellen auf ($TNFR1^{EC-KO}$) oder sind von dieser Deletion nicht betroffen und dienen als Kontrollen ($TNFR1^{FL}$).

Der transgene Status der Tiere wurde mittels PCR (2.2.2.2) überprüft und mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (2.2.2.3) visualisiert.

Um zu überprüfen, ob diese gewebespezifische Deletion des TNFR1 *per se* Leberentzündung oder andere phänotypische Merkmale induziert, wurden sowohl junge als auch alte Tiere beider Genotypen untersucht. Die ALT-Messung (2.2.4) ergab bei jungen Tieren, wie in Abbildung 19 zusammengefasst, keinen signifikanten Unterschied und keinen Hinweis auf eine Entzündung der Leber zwischen beiden Genotypen. Dieses Ergebnis ließ sich histologisch anhand H&E gefärbter (2.2.6.2) Leberpräparate bestätigen. Abbildung 19 zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Lebern von $TNFR1^{FL}$ sowie $TNFR1^{EC-KO}$ Tieren.

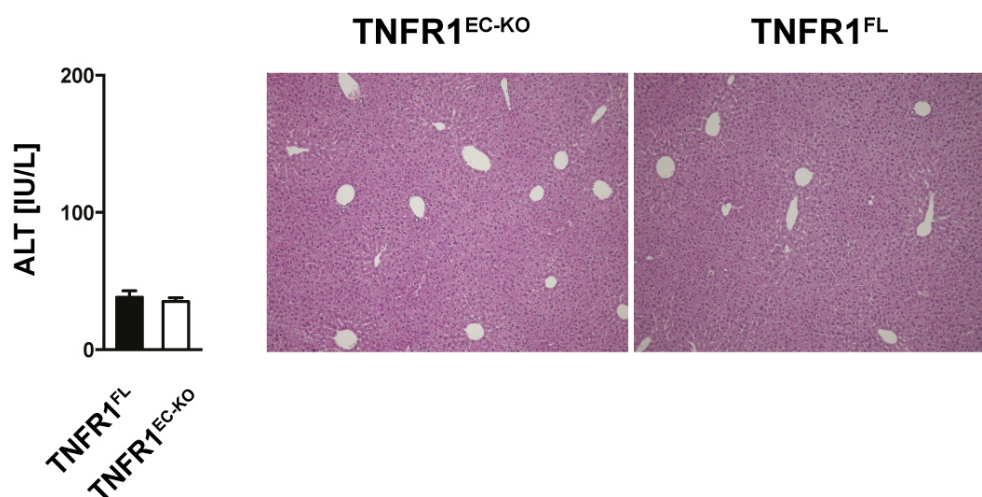


Abb. 19: Serum-ALT-Messung von unbehandelten jungen $TNFR1^{EC-KO}$ und $TNFR1^{FL}$ Tieren. Angaben +/- SEM. n = 2-6.
Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von H&E gefärbten Lebern der $TNFR1^{EC-KO}$ und $TNFR1^{FL}$ Tiere.

Die ALT-Untersuchung alter Tiere ergab, wie in Abbildung 20 zusammengefasst, ebenfalls keine signifikanten Unterschied zwischen den beiden Genotypen und auch keine Hinweise auf eine sich im Laufe der Zeit entwickelnde Leberentzündung. Abbildung 20 zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Lebern von alten $TNFR1^{FL}$ sowie $TNFR1^{EC-KO}$ Tieren.

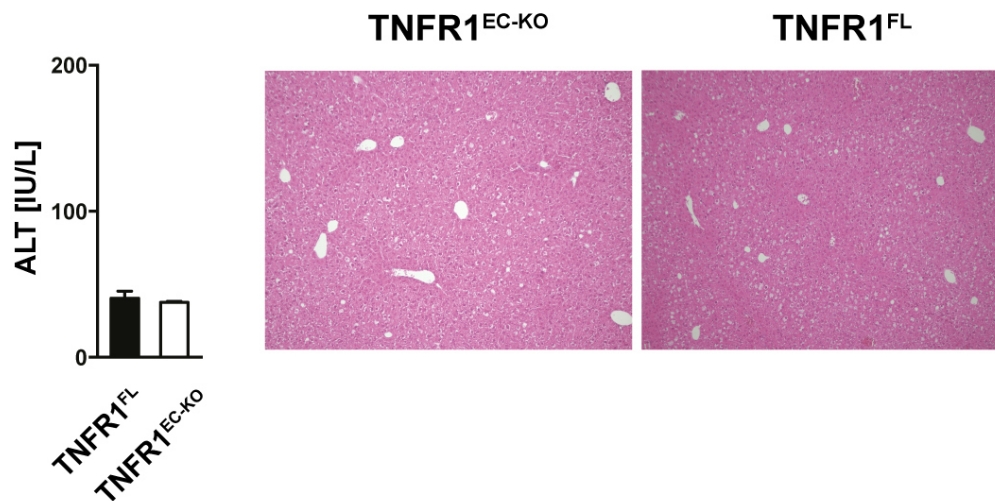


Abb. 20: Serum-ALT-Messung von unbehandelten alten TNFR1^{EC-KO} und TNFR1^{FL} Tieren. Angaben +/- SEM. n = 2-6.
Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von H&E gefärbten Lebern der TNFR1^{EC-KO} und TNFR1^{FL} Tiere.

Weder bei jungen noch bei alten TNFR1^{EC-KO} oder TNFR1^{FL} Tieren wurden geschädigte Bereiche der Leber gefunden. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der Transaminasen-Messung und die histologische Leberanalyse keinen Hinweis auf eine *per se* bestehende Leberentzündung oder Leberschädigung dieser Tiere. Auch konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden.

3.1.8 TNFR1^{EC-KO} Tiere sind im ConA Modell nicht vor Leberschaden geschützt

Die Rolle des endothelresidenten TNFR1 in diesem Modell wurde in ConA-Experimenten untersucht. TNFR1^{EC-KO} Tiere und deren TNFR1^{FL} Geschwistertiere wurden für 8 h gewichtsadaptiert mit ConA oder PBS behandelt (2.2.1). Nach Ende des Experiments wurde eine Serum-ALT Messung aller Tiere durchgeführt (2.2.4). Abbildung 21 zeigt zusammenfassend die graphisch dargestellten Ergebnisse der Serum-ALT-Messung aus mehreren unabhängigen Experimenten.

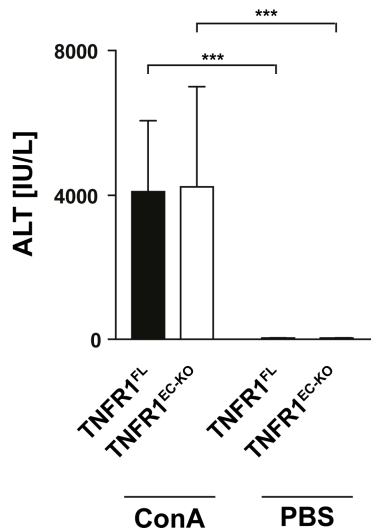


Abb. 21: Serum-ALT-Messung der 8 h mit ConA oder PBS behandelten TNFR1^{FL} und TNFR1^{EC-KO} Tiere. Der Graph zeigt zusammengefasste Ergebnisse aus mehreren unabhängigen Experimenten. Angaben +/- SEM. n = 12; 13; 5; 5. *** = p < 0,001.

Die ALT-Untersuchung des Serums ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden behandelten Genotypen. Acht Stunden nach ConA-Gabe konnte bei beiden behandelten Gruppen im Mittel ein ALT-Wert von ca. 4000 IU/L gemessen werden. Die PBS-behandelten Tiere zeigten keine erhöhten ALT-Werte (Abb. 21).

Histologisch konnte ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden ConA-behandelten Gruppen festgestellt werden. H&E gefärbte (2.2.6.1) Leberschnitte der behandelten Tiere wurden mikroskopisch analysiert. In Abbildung 22 werden repräsentative mikroskopische Aufnahmen ConA- und PBS-behandelter TNFR1^{FL} und TNFR1^{EC-KO} Tiere gezeigt.

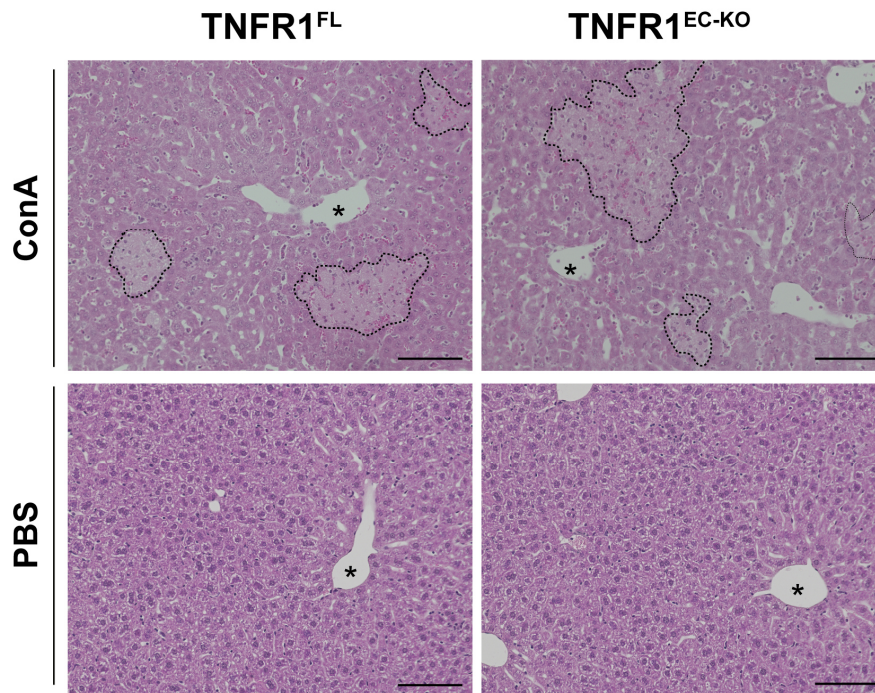


Abb. 22: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von H&E gefärbten Leberpräparaten 8 h nach ConA oder PBS Injektion in TNFR1^{FL} und TNFR1^{EC-KO} Tieren.

* = Zentralvene. Balken = 50 µm.

Gestrichelte Linie umrandet die geschädigte Fläche.

In beiden ConA-behandelten Gruppen sind gleichermaßen geschädigte Areale erkennbar, während die PBS-behandelten Kontrollgruppen keine Leberschädigung aufweisen (Abb. 22). Die statistische Auswertung der prozentuellen geschädigten Leberfläche ist in Abbildung 23 graphisch dargestellt.

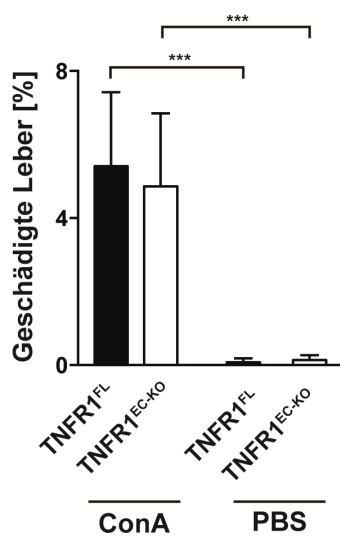


Abb. 23: Prozentuelle Auswertung geschädigter Leberareale 8 h nach Injektion von ConA oder PBS in TNFR1^{FL} und TNFR1^{EC-KO} Tieren. Der Graph zeigt zusammengefasste Ergebnisse aus mehreren unabhängigen Experimenten.

Angaben +/- SEM. n= 12; 13; 5; 5. *** = p < 0,001.

Der Vergleich der geschädigten Leberfläche beider Behandlungsgruppen weist mit im Mittel ca. 5 % (TNFR1^{EC-KO}) und ca. 5,5 % (TNFR1^{FL}) keinen statistisch signifikanten Unterschied auf. PBS-behandelte Kontrolltiere wiesen signifikant weniger Schädigung der Leber auf, die sich jedoch zwischen den Genotypen nicht unterschied (Abb. 23).

Zusammenfassend verdeutlichen diese Ergebnisse, dass die Endothel-spezifische Deletion des TNFR1 keinen Schutz vor Entzündung im ConA Modell der immunmedierten Hepatitis mit sich bringt.

3.1.9 Generierung und Charakterisierung der TNFR1^{MDC-KO} Linie

Da bereits gezeigt wurde, dass Makrophagen und neutrophile Granulozyten im ConA Modell von entscheidender Bedeutung sind^{72,106}, sollte überprüft werden, welche Funktion der TNFR1 auf diesen Zellen in diesem Kontext hat.

Für die Untersuchung der Rolle von TNFR1 auf Makrophagen und neutrophilen Granulozyten wurden TNFR1^{FL} Tiere mit Tieren gekreuzt, die Cre unter dem Lysozym M Promotor (LysM) exprimieren¹⁰⁴. Die aus dieser Kreuzung entstandenen Tiere weisen entweder eine Deletion des TNFR1 hauptsächlich auf Makrophagen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten auf (TNFR1^{MDC-KO}) bzw. sind von dieser Deletion nicht betroffen (TNFR1^{FL}). Die von dieser Deletion betroffenen Zellen (hauptsächlich Makrophagen, Monozyten und neutrophile Granulozyten), werden im Folgenden als MDCs (myeloid derived cells, Abkömmlinge der Knochenmark-Zellen) bezeichnet.

Sowohl junge als auch alte Tiere dieser Linie zeigten keine phänotypischen Auffälligkeiten. Um eine *per se* vorhandene Entzündung der Leber ausschließen zu können, wurden sowohl bei jungen als auch bei alten Tieren Serum-ALT-Messungen (2.2.4) und histologische Untersuchungen der Leber durchgeführt (2.2.6).

Abbildung 24 zeigt die graphisch dargestellten Ergebnisse der Serum-ALT-Messungen junger Tiere und repräsentative histologische Aufnahmen der untersuchten Lebern.

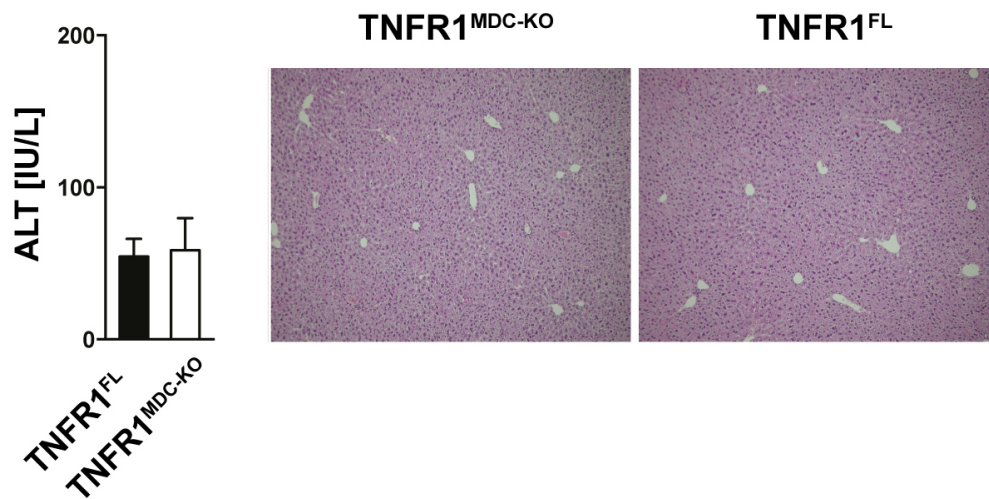


Abb. 24: Serum-ALT-Messung von unbehandelten jungen TNFR1^{MDC-KO} und TNFR1^{FL} Tieren. Angaben +/- SEM. n = 2-6.
Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von H&E gefärbten Lebern der TNFR1^{MDC-KO} und TNFR1^{FL} Tiere.

In Abbildung 25 sind die Ergebnisse der Untersuchungen alter Tiere dargestellt. Es sind sowohl die zusammengefassten Ergebnisse der Serum-ALT-Untersuchung als auch repräsentative histologische Aufnahmen von Lebern dieser Tiere dargestellt.

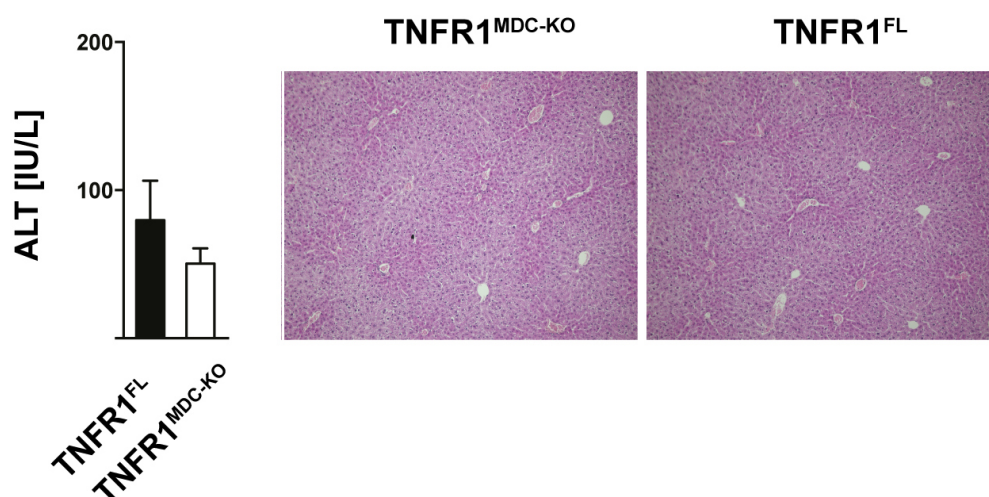


Abb. 25: Serum-ALT-Messung von unbehandelten alten TNFR1^{MDC-KO} und TNFR1^{FL} Tieren. Angaben +/- SEM. n = 2-6.
Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von H&E gefärbten Lebern der TNFR1^{MDC-KO} und TNFR1^{FL} Tiere.

Weder bei jungen noch bei alten Tieren beider Genotypen konnten erhöhte ALT-Werte gemessen werden. Im Mittel wurden bei allen Gruppen Serum-ALT-Werte von unter 100 IU/L gemessen. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Genotypen festgestellt werden (Abb. 24 + 25). Die histologische Untersuchung H&E gefärbter Leberschnitte zeigte sowohl bei jungen, als auch bei alten Tieren beider Genotypen keine geschädigten Leberareale und gab somit keinen Hinweis auf eine *per se* bestehende Leberentzündung (Abb. 24 + 25).

3.1.10 MDC-residenter TNFR1 ist essentiell für die Leberschädigung im ConA Modell

TNFR1^{MDC-KO} und TNFR1^{FL} Tieren wurde ConA oder PBS injiziert. Nach 8 h wurde der Grad der Leberschädigung untersucht. Nach Beenden des Experiments wurde eine Serum-ALT-Messung aller Tiere durchgeführt (2.2.4). Abbildung 26 zeigt die graphisch aufgearbeiteten Ergebnisse dieser Untersuchung.

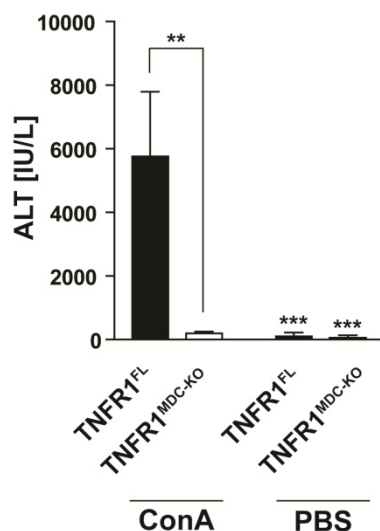


Abb. 26: Serum-ALT-Untersuchung 8 h nach ConA oder PBS Injektion in TNFR1^{FL} und TNFR1^{MDC-KO} Tieren. Der Graph zeigt zusammengefasste Ergebnisse aus mehreren unabhängigen Experimenten. Angaben +/- SEM. n= 15; 18; 10; 11. **= p < 0,01. *** = p < 0,001.

Bei den PBS-behandelten Kontrolltieren beider Genotypen konnte im Mittel ein ALT Wert von ca. 95 IU/L (TNFR1^{FL}, Abb. 26) bzw. von ca. 80 IU/L (TNFR1^{MDC-KO}, Abb. 26) gemessen werden.

Die Serum-ALT-Untersuchung der behandelten Tiere zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den ConA-behandelten Gruppen. Nach ConA-Gabe wurde in der TNFR1^{FL} Gruppe im Mittel ein ALT-Wert von ca. 6000 IU/L und damit ein deutlicher Anstieg gegenüber der PBS Kontrollgruppe gemessen (Abb. 26). Die Tiere, die jedoch keinen TNFR1 auf MDCs exprimierten (TNFR1^{MDC-KO}) waren vor ConA-induziertem Leberschaden geschützt (186,59 IU/L, Abb. 26). Zudem wurden H&E gefärbte histologische Präparate (2.2.6.2) von allen ConA- und PBS-behandelten Tieren angefertigt und

mikroskopisch analysiert. Abbildung 27 zeigt repräsentative Aufnahmen ConA- und PBS-behandelter $TNFR1^{FL}$ und $TNFR1^{MDC-KO}$ Tiere.

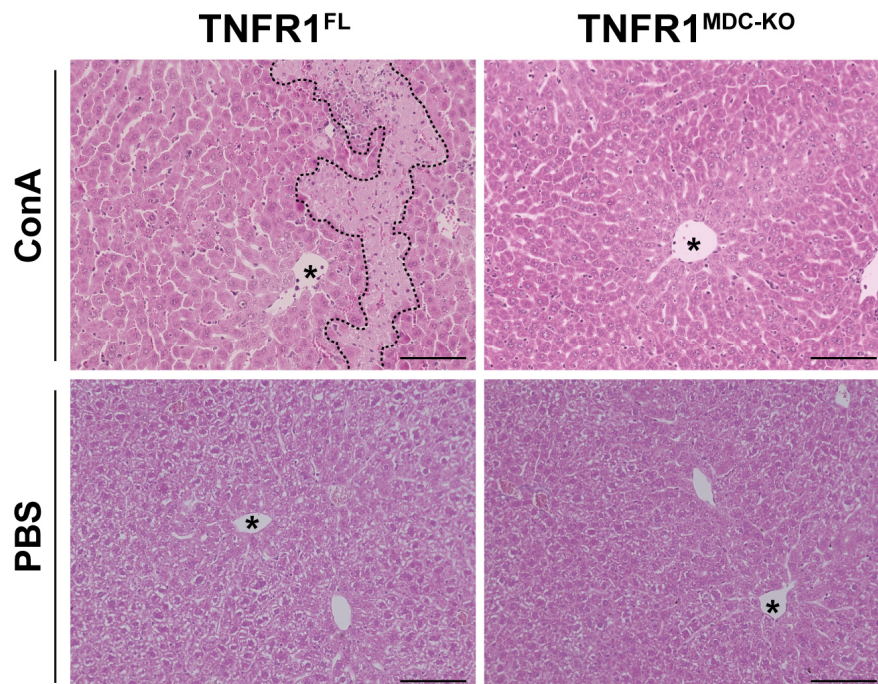


Abb. 27: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von H&E gefärbten Leberpräparaten 8 h nach ConA oder PBS Injektion in $TNFR1^{FL}$ und $TNFR1^{MDC-KO}$ Tieren.
 * = Zentralvene. Balken = 50 μ m.
 Gestrichelte Linie umrandet die geschädigte Fläche.

In Abbildung 28 sind die Ergebnisse der Quantifizierung geschädigter Leberareale 8 h nach ConA-Injektion graphisch dargestellt.

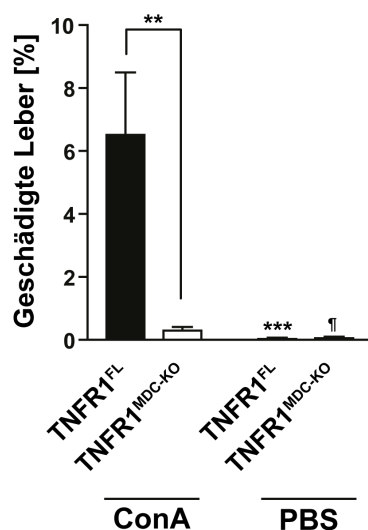


Abb. 28: Quantifizierung geschädigter Leberareale 8 h nach Injektion von ConA oder PBS in $TNFR1^{FL}$ und $TNFR1^{MDC-KO}$ Tieren. Der Graph zeigt zusammengefasste Ergebnisse aus mehreren unabhängigen Experimenten. Angaben +/- SEM. n= 15; 18; 10; 11. ** = p < 0,01. *** = p < 0,001. ¶ = keine statistische Signifikanz zwischen der ConA behandelten und der PBS behandelten $TNFR1^{MDC-KO}$ Gruppe.

Die Analyse der prozentuellen geschädigten Leberfläche bestätigte die Ergebnisse der ALT-Messung. Nach ConA-Behandlung wiesen die TNFR1^{MDC-KO} Tiere mit unter 1 % geschädigter Leberfläche keinen signifikanten Anstieg im Vergleich zu den PBS-behandelten Kontrollen (Abb. 28). Die ConA-behandelten TNFR1^{FL} Geschwisterkontrollen dagegen, zeigten mit über 6 % signifikant mehr geschädigte Leberfläche als die TNFR1^{MDC-KO} Gruppe (Abb. 28).

Zusätzlich wurde sowohl in allen Gruppen die Länge der Milz 8 h nach Behandlung ermittelt und in Abbildung 29 graphisch dargestellt.

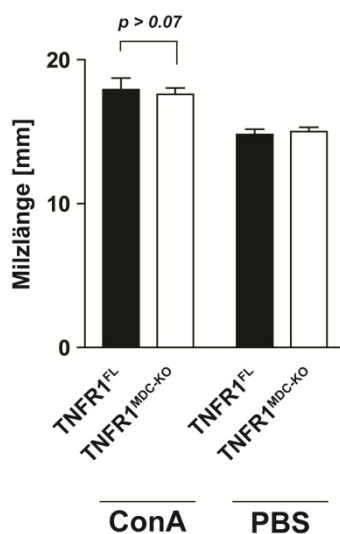


Abb. 29: Milzlänge von 8 h mit ConA oder PBS behandelten TNFR1^{FL} und TNFR1^{MDC-KO} Tieren. Der Graph zeigt zusammengefasste Ergebnisse aus mehreren unabhängigen Experimenten. Angaben +/- SEM. n = 15; 18; 10; 11.

Es konnte bei beiden ConA-behandelten Gruppen im Vergleich zu den PBS-behandelten Gruppen ein signifikanter Anstieg der Milzlänge 8 h nach Injektion festgestellt werden. Zwischen den beiden ConA-behandelten Genotypen ist ein Trend sichtbar, der jedoch statistisch nicht signifikant ist: Bei der in diesem Modell vor Entzündung geschützten TNFR1^{MDC-KO} Gruppe konnte im Mittel eine Milzlänge von 15,3 mm festgestellt werden, während die im Mittel gemessene Länge der TNFR1^{FL} Gruppe mit 16,3 mm tendenziell größer war (Abb. 29). Trotz des fehlenden Leberschadens konnte bei der Analyse der Milz keinen Unterschied zwischen den in diesem Modell geschützten TNFR1^{MDC-KO} und den nicht vor Leberentzündung geschützten TNFR1^{FL} Geschwisterkontrolltieren festgestellt werden.

Um die in diesem Modell geschützten TNFR1^{MDC-KO} Tiere weiter zu untersuchen wurden diese und ihre TNFR1^{FL} Geschwisterkontrollen jeweils für 1, 2, 4, 6 und 8 h mit ConA behandelt und anschließend hinsichtlich verschiedener Parameter untersucht. Als weitere Kontrolle wurden jedes Mal auch unbehandelte TNFR1^{MDC-KO} und TNFR1^{FL} Tiere untersucht. Die Messung der Serum-ALT (2.2.4) erfolgte ebenfalls für jedes Tier. Abbildung 30 zeigt den Verlauf der gemessenen Serum-ALT zu den verschiedenen Zeitpunkten.

Die im Serum gemessene ALT ist bei unbehandelten Tieren beider Genotypen im Mittel gleich niedrig. In Folge der ConA-Gabe steigt die ALT der TNFR1^{FL} Gruppe deutlich im Vergleich zu der der TNFR1^{MDC-KO} Gruppe (Abb. 30). Bei der TNFR1^{FL} Gruppe konnte ein sehr starker Anstieg der ALT gegenüber der unbehandelten Gruppe gemessen werden, der mit im Mittel 627,9 IU/L bereits 4 h nach Behandlung den Wert der TNFR1^{MDC-KO} Gruppe der im Mittel bei 184,3 IU/L lag deutlich überstieg. Die späteren Messzeitpunkte zeigten einen immer deutlicher werdenden Anstieg der ALT der TNFR1^{FL} Gruppe gegenüber des Ausgangswertes und gegenüber der TNFR1^{MDC-KO} Gruppe. Acht Stunden nach Behandlung wurde das Experiment beendet. Die gemessene Serum-ALT der TNFR1^{MDC-KO} Gruppe war signifikant geringer als die der TNFR1^{FL} Gruppe und zeigt den Schutz vor Leberschädigung in diesem Modell an (Abb. 30).

Um den Schutz der TNFR1^{MDC-KO} Tiere näher zu charakterisieren, wurden mittels ELISA (2.2.5) verschiedene Zytokine zusätzlich zu TNF im Serum gemessen, die bereits in der Literatur für dieses Modell als wichtig publiziert wurden. Da es bereits bekannt ist, dass IFN γ ^{-/-} Tiere vor einer ConA-induzierten Entzündung geschützt sind, wurde die IFN γ -Konzentration im Serum bestimmt^{107,108}. Es wurde auch die IL-1 β -Konzentration gemessen, da dieses Zytokin ein wesentlicher proinflammatorischer Mediator ist¹⁰⁹. Zusätzlich wurde die Konzentration an IL-6 bestimmt, da es bekannt ist, dass IL-6^{-/-} Tiere einen gewissen Schutz vor Leberschaden im ConA Modell entwickeln¹¹⁰. Da eine Depletion des Zytokins IL-4 ebenfalls vor Leberschädigung schützen soll¹¹¹, wurde auch die Serum-Konzentration dieses Zytokins bestimmt. Es wurde auch die Serum-Konzentration des Zytokins IL-10 bestimmt, da diesem Zytokin eine protektive Funktion im ConA Modell zugeschrieben wurde^{112,113}. Für die Messungen wurden stets TNFR1^{MDC-KO} und deren TNFR1^{FL} Geschwisterkontrolltiere untersucht. Abbildung 30 zeigt die aus mehreren Experimenten zusammengefassten Ergebnisse der ELISA und Serum-ALT Untersuchungen.

ConA Injektion

□ TNFR1^{MDC-KO}
● TNFR1^{FL}

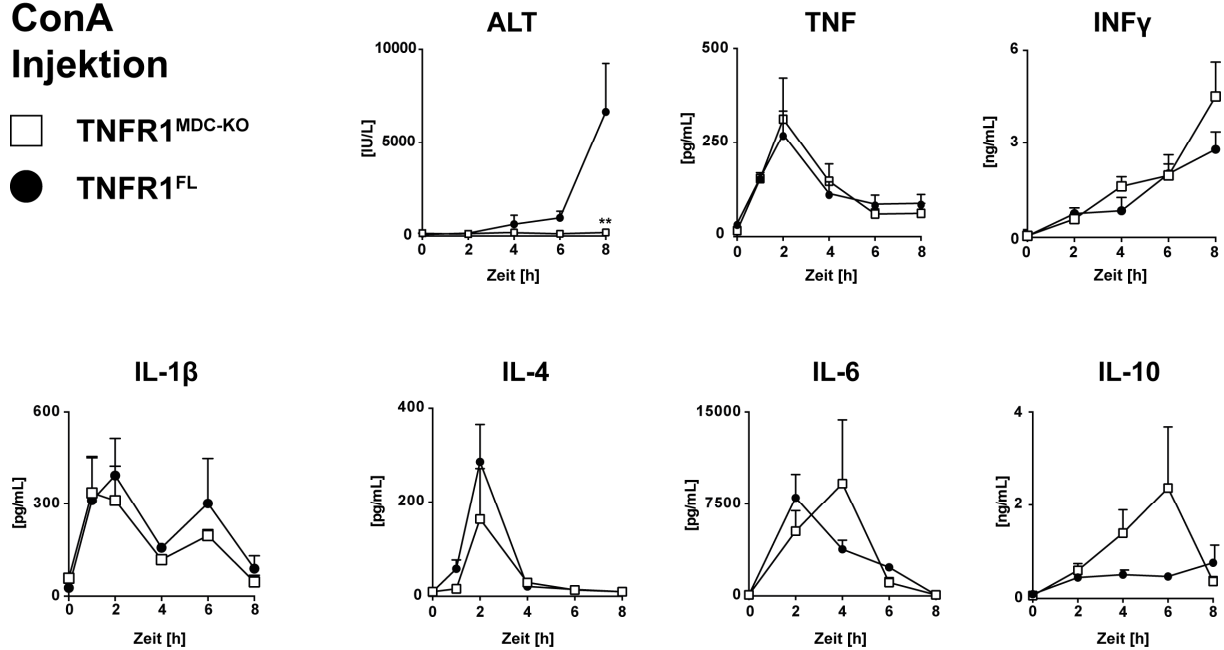


Abb. 30: Serum-ALT-Bestimmung und Serum-Konzentrations-Messung verschiedener Zytokine in unbehandelten und für 1-8 h mit ConA behandelten TNFR1^{MDC-KO} und TNFR1^{FL} Tieren. Angaben +/- SEM. n = 2-8 pro Zeitpunkt.

Bei keinem der gemessenen Zytokine zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der TNFR1^{MDC-KO} und der TNFR1^{FL} Gruppe (Abb. 30). TNF wird von beiden Gruppen vor und nach ConA-Behandlung in gleicher Menge produziert. In beiden Fällen konnte die maximale Konzentration 2 h nach Behandlung im Serum gemessen werden. Die Messung des Zytokins INFγ zeigte ebenfalls einen parallelen Konzentrationsverlauf beider Gruppen. Nach ConA-Gabe steigt die Konzentration des Zytokins mit der Zeit an. Ebenfalls verlief die gemessene Expression des Zytokins IL-1β im Serum beider untersuchten Gruppen mit einem Konzentrationsmaximum zwischen 1 und 2 h nach Behandlung, gleich. Die Analyse des Zytokins IL-4 zeigte in beiden Fällen ein Serum-Konzentrationsmaximum 2 h nach Behandlung das zwischen den beiden untersuchten Genotypen keinen Unterschied aufwies. Die höchste Serum-Konzentration an IL-6 wurde in der TNFR1^{MDC-KO} Gruppe 4 h und in der TNFR1^{FL} Gruppe 2 h nach ConA-Gabe gemessen. Zwischen den beiden Gruppen konnte zu keinem der Zeitpunkte ein statistisch signifikanter Unterschied in der Serum-Konzentration des Zytokins IL-6 gemessen werden.

Die Messung von IL-10 ergab in beiden Fällen einen zeitbedingten Anstieg der sezernierten Zytokinmenge und zeigte einen nicht signifikanten Trend zwischen den beiden untersuchten Gruppen: Bei den TNFR1^{FL} Kontrolltieren konnte ein Konzentrationsmaximum 8 h nach Behandlung

gemessen werden während die maximal gemessene Zytokinkonzentration bei der TNFR1^{MDC-KO} Gruppe bereits 6 h nach ConA-Behandlung vorhanden war (Abb. 30).

Weitere Untersuchungen der beiden TNFR1^{MDC-KO} und TNFR1^{FL} Gruppen erfolgten auf mRNA-Ebene. Leberproben beider Gruppen wurden 1, 2, 4 oder 6 h nach ConA-Behandlung auf die mRNA-Expression verschiedener Chemokine hin untersucht, die im Kontext der Entzündung in der Literatur bereits beschrieben wurden. Als Kontrolle dienten Proben nicht behandelter Tiere. Die Expression wurde auf das Haushaltsgen GAPDH normalisiert. Um einen Vergleich der beiden Genotypen untereinander zu ermöglichen wurde die mRNA-Expression der nicht behandelten TNFR1^{FL} Gruppe gleich eins gesetzt (2.2.10.4).

Die Ergebnisse der Genexpression der untersuchten Chemokine wurden graphisch dargestellt und in Abb. 31 zusammengefasst. Ebenfalls in Abb. 31 ist die Serum-Konzentration des mittels ELISA (2.2.4) untersuchten Chemokins CXCL2 (MIP-2) dargestellt.

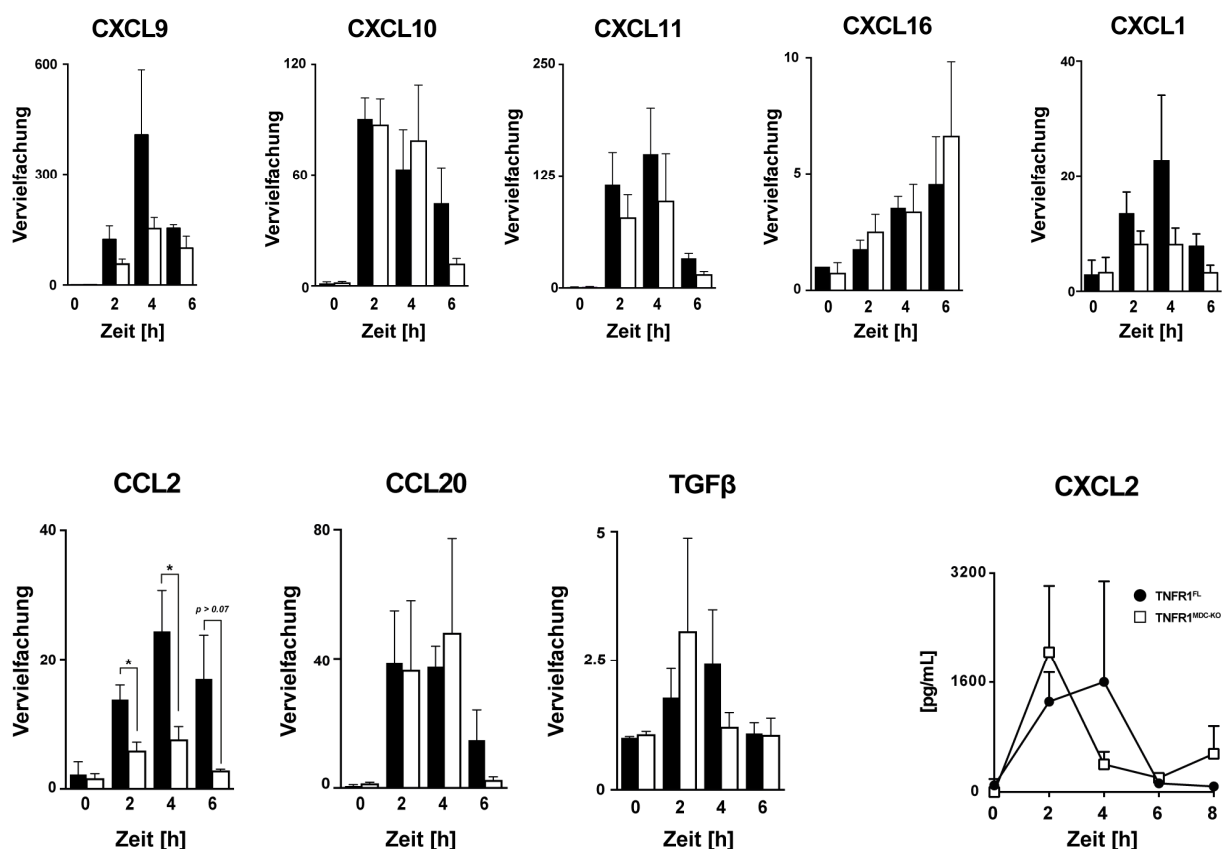


Abb. 31: Serum-CXCL2-Bestimmung und Genexpression verschiedener Chemokine in unbehandelten und für 2-8 h mit ConA behandelten TNFR1^{MDC-KO} und TNFR1^{FL} Tieren. Angaben +/- SEM. n = 2-8 pro Zeitpunkt. * = p < 0,05.

Die Untersuchung der mRNA-Expression der Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11, ergab in Folge der ConA-Behandlung keinen signifikanten Unterschied zwischen der in diesem Modell vor Leberentzündung geschützten TNFR1^{MDC-KO} Gruppe und der TNFR1^{FL} Geschwisterkontrollgruppe (Abb. 31). Ebenfalls konnte bei der Untersuchung der mRNA-Expression der Chemokine CXCL16, CXCL1, CCL20 und TGFβ kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Das im Serum via ELISA untersuchte Chemokin CXCL2 wurde bei beiden behandelten Gruppen in ähnlicher Menge und signifikant nicht unterschiedlich sezerniert (Abb. 31). Die mRNA Untersuchung des Chemokins CCL2 zeigte 2 und 4 h nach ConA-Gabe einen signifikanten Expressionsunterschied: Bei der vor Leberentzündung geschützten TNFR1^{MDC-KO} Gruppe konnte 2 und 4 h nach ConA-Behandlung eine signifikant geringere Expression des Chemokins auf mRNA-Ebene gemessen werden. Sechs Stunden nach ConA-Gabe konnte dieser Trend weiterhin festgestellt werden, die Messung ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied (Abb. 31).

Intrakardiales Blut ConA-behandelter und unbehandelter TNFR1^{MDC-KO} und TNFR1^{FL} Tieren wurde wie unter 2.2.7 beschrieben hämatologisch untersucht. Die Blutzusammensetzung beider Genotypen wurde 1, 2, 4 und 6 h nach ConA-Gabe analysiert und mit Werten unbehandelter Tiere beider Gruppen verglichen. Abbildung 32 zeigt zusammenfassend die graphische Darstellung dieser Analysen.

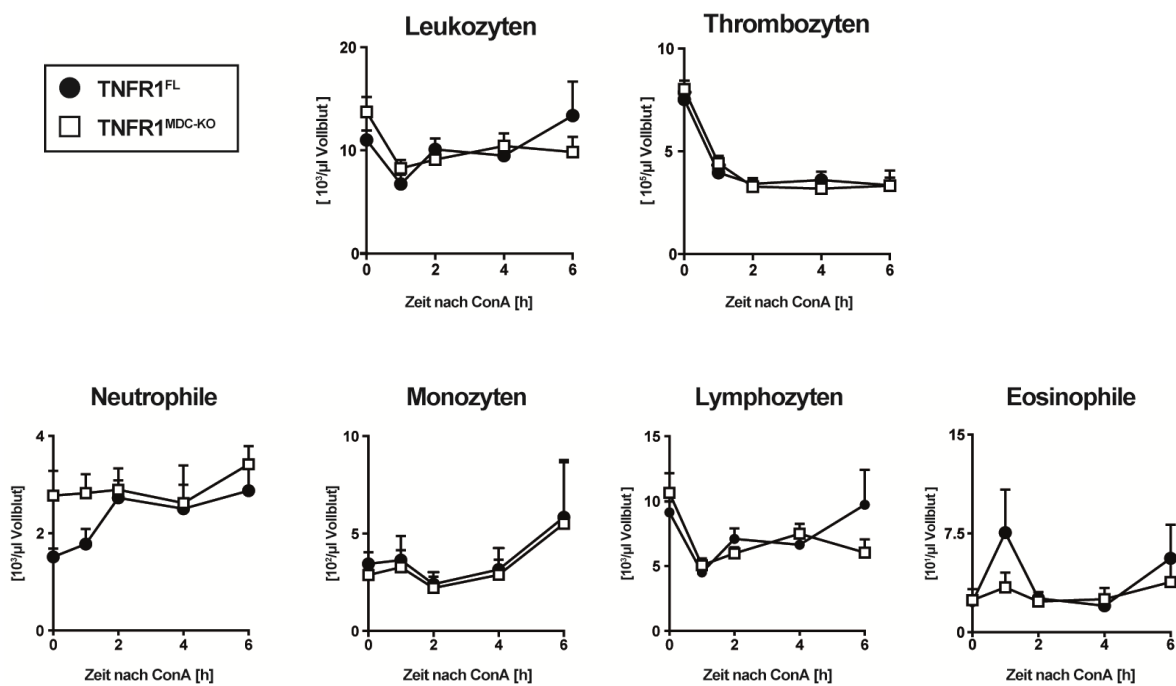


Abb. 32: Hämatologische Untersuchungen von Blut unbehandelter und für 1-6 h mit ConA behandelter TNFR1^{MDC-KO} und TNFR1^{FL} Tiere. Angaben +/- SEM. n = 4-10 pro Zeitpunkt.

Die Anzahl untersuchter Zellen im Blut der TNFR1^{MDC-KO} und TNFR1^{FL} Tiere unterscheidet sich nach ConA-Gabe nicht. Ebenfalls unterscheidet sich die Zusammensetzung des Blutes beider unbehandelten Gruppen *per se* bis auf eine Ausnahme nicht. Die Anzahl der gemessenen neutrophilen Granulozyten ist in der unbehandelten TNFR1^{MDC-KO} Gruppe signifikant höher als in der TNFR1^{FL} Gruppe (Abb. 32). In Folge der ConA-Gabe relativiert sich dieser Unterschied jedoch: Die Anzahl der in Blut vorhandenen neutrophilen Granulozyten steigt in der TNFR1^{FL} Gruppe steil an und erreicht 2 h nach Behandlung den Wert der TNFR1^{MDC-KO} Gruppe. Bei der TNFR1^{MDC-KO} Gruppe ist bis 2 h nach ConA-Gabe nur ein moderater Anstieg der gezählten neutrophilen Granulozyten zu verzeichnen. Zu den weiteren untersuchten Zeitpunkten, 4 und 6 h nach ConA Gabe, ist die Anzahl an neutrophilen Granulozyten beider Gruppen gleich hoch (Abb. 32).

Die Analyse weiterer Zellpopulationen wie Thrombozyten, Monozyten, Lymphozyten und eosinophile Granulozyten zeigte keinen signifikanten Unterschied. Der Anstieg und Abfall der Zellzahl verlief in beiden Gruppen gleich (Abb. 32).

Um die Chemotaxis verschiedener relevanter Zellen zu untersuchen, wurden die Lebern der TNFR1^{MDC-KO} und der TNFR1^{FL} Kontrolltiere zunächst auf histologischer Ebene hinsichtlich der von dem konditionellen Knock-Out betroffenen Zellpopulationen untersucht. Um die Anzahl der neutrophilen Granulozyten in der Leber bestimmen zu können wurde eine Ly6G-Färbung wie unter 2.2.6.4 beschrieben durchgeführt und anschließend mikroskopisch analysiert. Abbildung 33 zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Ly6G-Färbung.

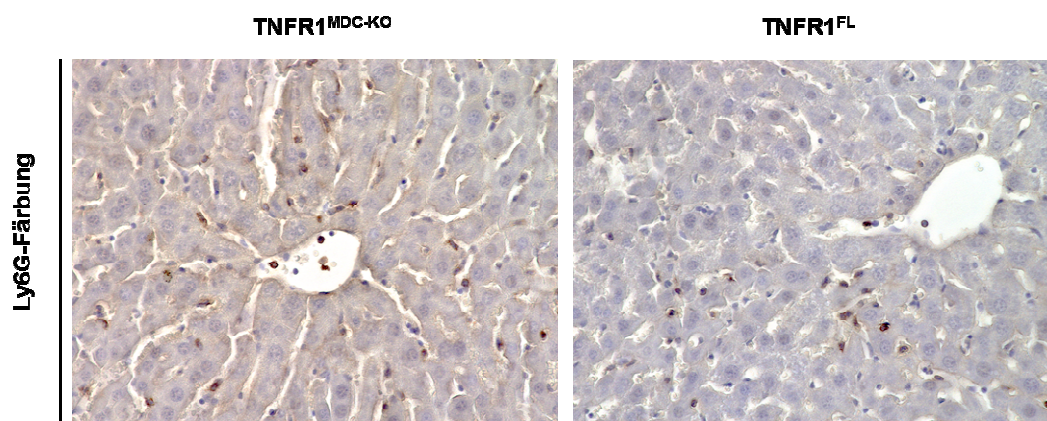


Abb. 33: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von Lebern der ConA behandelten TNFR1^{MDC-KO} und TNFR1^{FL} Tiere. In den Leberpräparaten wurden die neutrophilen Granulozyten mit einem Antikörper gegen Ly6G detektiert.

Die Anzahl der mit Hilfe des Programms ImageJ gezählten Ly6G positiven neutrophilen Granulozyten in der Leber ist in Abbildung 34 dargestellt.

ConA-
Injektion

□ TNFR1^{MDC-KO}
● TNFR1^{FL}

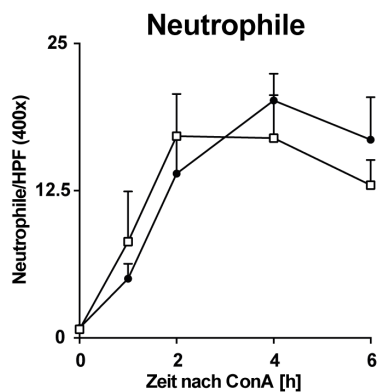


Abb. 34: Anzahl neutrophiler Granulozyten pro Lichtfeld x400 in der Leber un behandelter oder für unterschiedliche Zeit mit ConA behandelter TNFR1^{MDC-KO} und TNFR1^{FL} Tiere. Angaben +/- SEM aus je 20 mikroskopischen Aufnahmen pro Tier. n = 2-8 pro Zeitpunkt.

Die Analyse der mit einem Antikörper gegen Ly6G gefärbten Leberpräparate zeigte keinen Unterschied in der Anzahl der leberresidenten neutrophilen Granulozyten. In beiden untersuchten Gruppen konnte ein zeitabhängiger Anstieg der leberresidenten neutrophilen Granulozyten verzeichnet werden jedoch wurden zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikante Unterschiede zwischen der TNFR1^{MDC-KO} und der TNFR1^{FL} Gruppe sichtbar (Abb. 34).

Ebenfalls wurde die Anzahl der F4/80 positiven Makrophagen in der Leber immunhistochemisch bestimmt. Hierfür wurden Leberpräparate der beiden untersuchten Tiergruppen, TNFR1^{MDC-KO} und TNFR1^{FL}, 8 h nach ConA-Gabe, zum Zeitpunkt des signifikanten Unterschieds der ALT, mit einem Antikörper gegen F4/80 wie unter 2.2.6.3 beschrieben gefärbt. In Abbildung 35 sind repräsentative mikroskopische Aufnahmen dieser Präparate dargestellt.

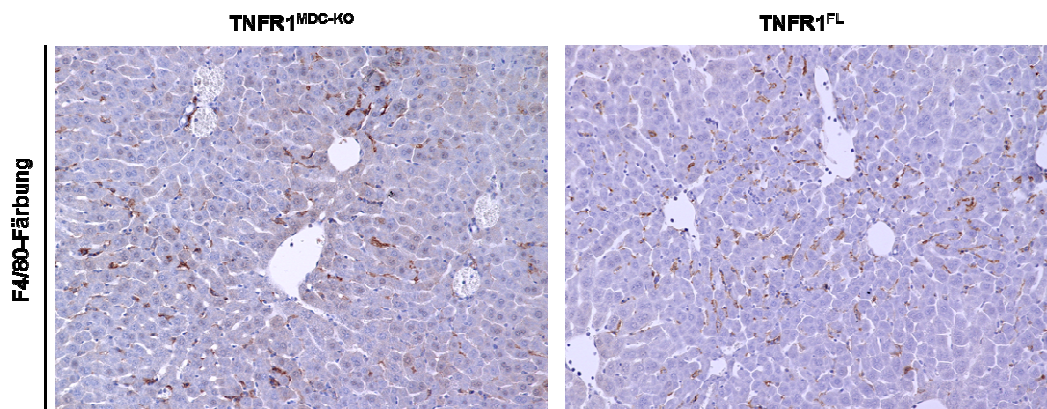


Abb. 35: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von Lebern der ConA behandelten TNFR1^{MDC-KO} und TNFR1^{FL} Tiere. In den Leberpräparaten wurden die Makrophagen mit einem Antikörper gegen F4/80 detektiert.

Die Präparate wurden anschließend mikroskopisch analysiert und mit Hilfe des Programms ImageJ hinsichtlich der Anzahl der F4/80 positiven Zellen ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 36 zusammengefasst.

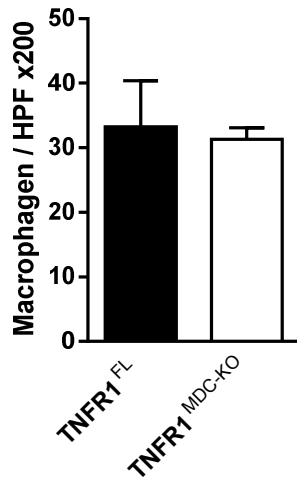


Abb. 36: Anzahl der Makrophagen pro Lichtfeld x200 in der Leber von TNFR1^{MDC-KO} und TNFR1^{FL} Tieren 8 h nach ConA Injektion Angaben +/- SEM aus je 10 mikroskopischen Aufnahmen pro Tier. n = 8; 11.

Die Auswertung der so gefärbten Präparate ergab keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl der F4/80 positiven Makrophagen beider untersuchten TNFR1^{MDC-KO} und TNFR1^{FL} Gruppen. Es konnte festgestellt werden, dass sich in den Lebern der vor Leberschaden geschützten TNFR1^{MDC-KO} Tiere 8 h nach ConA Gabe genauso viele F4/80 positive Makrophagen befanden wie in den Lebern der suszeptiblen TNFR1^{FL} Geschwistertieren (Abb. 36).

Für eine bessere Charakterisierung wurden einzelne Zellpopulationen in Blut oder Leber ConA-behandelter und unbehandelter TNFR1^{MDC-KO} und TNFR1^{FL} Tiere durchflusszytometrisch analysiert und quantifiziert (2.2.8).

Zunächst wurde der relative Anteil verschiedener Zellpopulationen der angeborenen und adaptiven Immunantwort im Blut unbehandelter TNFR1^{MDC-KO} und TNFR1^{FL} Tiere durchflusszytometrisch analysiert. Die Auswertung dieser Ergebnisse ist in Abb. 37 zusammengefasst.

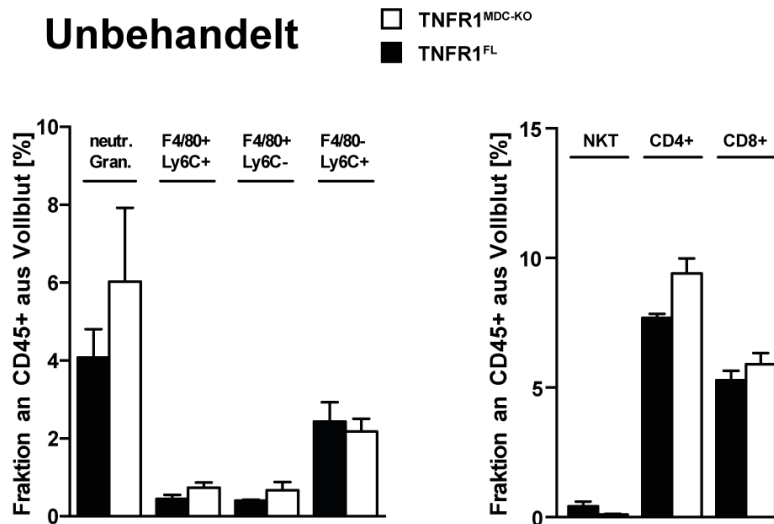


Abb. 37: Prozentueller Anteil an neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, NKT- und T-Zellen im Blut unbehandelter TNFR1^{MDC-KO} und TNFR1^{FL} Tiere. Angaben +/- SEM. Prozentueller Anteil der CD45⁺ Zellen. n = 3.

Im Blut unbehandelter TNFR1^{MDC-KO} und TNFR1^{FL} Tiere waren prozentuell ähnlich viele neutrophile Granulozyten, F4/80⁺ Makrophagen, F4/80⁻ Monozyten, NKT-Zellen sowie CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen.

Da vor Kurzem ein Konzept vorgeschlagen wurde, bei dem unterschiedliche Makrophagen-Populationen unterschiedliche Aufgaben im Rahmen einer bakteriellen Infektion übernehmen¹¹⁴, wurde untersucht, ob dieses Konzept auf das Modell der ConA-induzierten Hepatitis übertragbar ist. Es wurde der relative Anteil der Ly6C⁺ (inflammatorischen) und Ly6C⁻ (residenten) Makrophagen in der Leber durchflusszytometrisch erfasst. In Abbildung 38 sind die Ergebnisse der prozentuellen Analyse zusammengefasst.

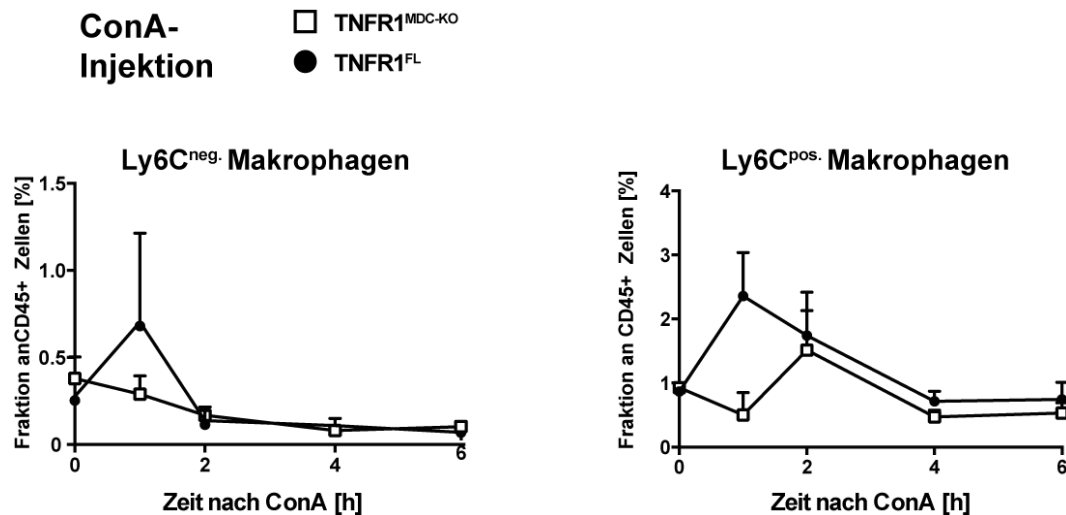


Abb. 38: Prozentueller Anteil Ly6C^{neg} (residenter) und Ly6C^{pos} (inflammatorischer) Makrophagen in der Leber von unbehandelten und von ConA behandelten TNFR1^{MDC-KO} und TNFR1^{FL} Tieren. Angaben +/- SEM. Prozentueller Anteil der CD45⁺ Zellen. n = 2-8 pro Zeitpunkt.

In der Leber unbehandelter und mit ConA behandelter TNFR1^{MDC-KO} und TNFR1^{FL} Tiere konnte zu keinem Zeitpunkt ein statistisch signifikanter Unterschied in dem prozentuellen Anteil der Ly6C⁺ (inflammatorischen) und Ly6C⁻ (residenten) Makrophagen festgestellt werden (Abb. 38).

3.1.11 Mechanistische Untersuchungen der TNFR1^{MDC-KO} Gruppe im ConA Modell bei zusätzlicher Behandlung mit Galactosamin

Weitere Untersuchungen auf mechanistischer Ebene erfolgten mit Hilfe des Transkriptionshemmers Galactosamin (Gal). TNFR1^{MDC-KO} Tiere und die TNFR1^{FL} Kontrolltiere wurden vor der ConA-Injektion zusätzlich mit Gal behandelt und für 12 h beobachtet. In Abbildung 39 ist das Überleben der Tiere graphisch dargestellt.

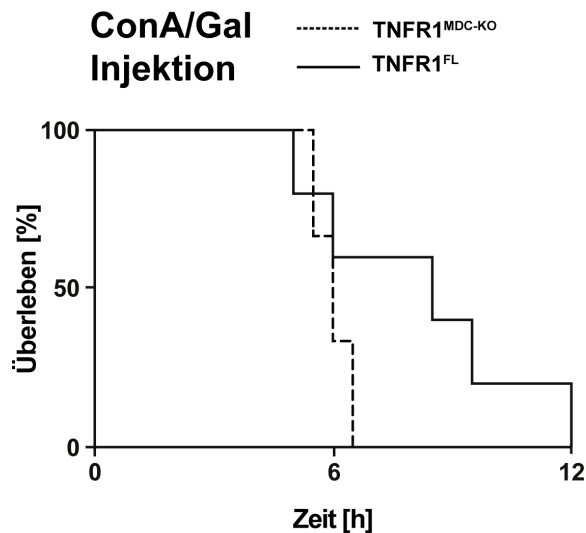


Abb. 39: Überleben der TNFR1^{FL} und TNFR1^{MDC-KO} Gruppe nach Behandlung mit Gal und ConA im Beobachtungszeitraum von 12 h. n = 5; 3.

Die TNFR1^{MDC-KO} Tiere, die vor ConA-induziertem Leberschaden geschützt waren, sterben bei zusätzlicher Behandlung mit Gal innerhalb von 12 h. Die gleiche Mortalität kann auch bei den TNFR1^{FL} Kontrolltieren beobachtet werden (Abb. 39).

Um den Leberschaden der Tiere in diesem Experimentaufbau quantifizieren zu können, wurden erneut TNFR1^{MDC-KO} und TNFR1^{FL} Tiere mit Gal und anschließend mit ConA behandelt. Zusätzlich wurden im selben Experimentaufbau Tiere beider Gruppen ausschließlich mit ConA oder Gal behandelt. Nach 5 h wurden Serum-ALT-Messungen durchgeführt (2.2.4), die in Abbildung 40 graphisch dargestellt sind.

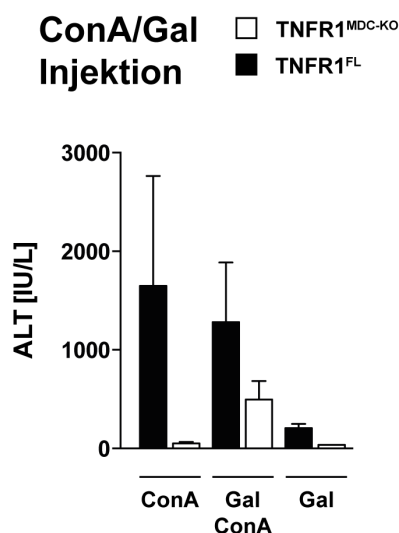


Abb. 40: Serum-ALT-Messung 5 h nach ConA, ConA und Gal oder Gal Injektion der TNFR1^{FL} und TNFR1^{MDC-KO} Tiere. Angaben +/- SEM. n = 2; 2; 4; 4; 2; 2.

Die ausschließlich mit ConA behandelten TNFR1^{MDC-KO} Tiere hatten, wie erwartet, einen sehr niedrigen ALT-Spiegel. Sie waren, wie zuvor bereits gezeigt, vor ConA-induziertem Leberschaden geschützt. Ebenfalls konnte bei den TNFR1^{FL} Kontrollen, wie erwartet, ein deutlicher Anstieg der ALT-

Werte verzeichnet werden, der auf Leberschaden hindeutet. Bei den ausschließlich mit Gal behandelten Gruppen wurde ebenfalls ein niedriger ALT-Spiegel im Serum gemessen. Die ALT-Werte waren im Vergleich zu unbehandelten Tieren erhöht, jedoch dennoch im niedrigen Bereich. Dies deutet darauf hin, dass die alleinige Gal-Behandlung innerhalb von 5 h nicht zur Erhöhung der Transaminasen im Serum und somit nicht zum Leberschaden führt.

Die sowohl mit Gal als auch mit ConA behandelten TNFR1^{MDC-KO} Tiere wiesen nach 5 h mit im Mittel 500 IU/L erhöhte Serum-ALT Werte auf. Diese Gruppe zeigte einen Anstieg der Serum-ALT im Vergleich zu der Gruppe die ausschließlich mit ConA behandelt wurde (Abb. 40). Diese Ergebnisse zeigen, dass die zusätzliche Gabe von Gal die zuvor geschützten Tiere sensibilisiert, sodass sie in Folge der ConA-Behandlung ebenfalls einen messbaren Leberschaden bekommen.

3.1.12 Mechanistische Untersuchungen der TNFR1^{MDC-KO} Tiere mittels Blockade des IL-10-Rezeptors

TNFR1^{MDC-KO} Tiere sind vor ConA-induziertem Leberschaden geschützt (Abb. 26). Um die TNF/TNFR1 Signalkaskade in dieser Gruppe näher zu charakterisieren, wurde die Sezernierung von verschiedenen in der Literatur in diesem Kontext bereits beschriebenen Zytokine untersucht (Abb. 30). In Folge der ELISA-Messungen zeigte sich bei der vor Leberschaden geschützten TNFR1^{MDC-KO} Gruppe im Vergleich zu der nicht geschützten TNFR1^{FL} Gruppe ein Anstieg des Serum-Zytokins IL-10, der jedoch nicht signifikant war (Abb. 30).

Das antiinflammatorische Zytokin IL-10 wurde im Kontext des ConA-induzierten Schadens bereits als protektiv beschrieben^{92,112,113}. Um zu überprüfen, ob der beschriebene Schutz der TNFR1^{MDC-KO} Gruppe auf den Anstieg der IL-10-Produktion zurückzuführen ist, wurden sowohl TNFR1^{MDC-KO} als auch TNFR1^{FL} Tiere 2 h vor der ConA-Injektion mit einem Antikörper gegen den IL-10-Rezeptor behandelt. Im selben Experimentaufbau wurden Tiere beider Genotypen ebenfalls nur mit ConA behandelt. Acht Stunden nach der ConA Injektion wurden Serum-ALT-Messungen aller Gruppen durchgeführt (2.2.4). In Abbildung 41 sind die Ergebnisse dieser Messungen graphisch dargestellt.

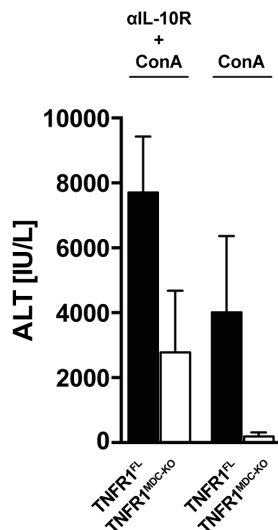


Abb. 41: Serum-ALT-Messung 8 h nach ConA oder ConA und αIL-10R Injektion der TNFR1^{FL} und TNFR1^{MDC-KO} Tiere. Angaben +/- SEM. n= 9; 7; 4; 2.

In Folge der alleinigen ConA-Behandlung konnte bei der TNFR1^{MDC-KO} Gruppe, wie erwartet und bereits gezeigt, ein sehr niedriger ALT-Spiegel gemessen werden. Der gemessene ALT-Spiegel der TNFR1^{FL} Gruppe lag erwartungsgemäß mit im Mittel ca. 4000 IU/L deutlich höher als der der TNFR1^{MDC-KO} Gruppe und deutet auf eine Leberschädigung hin (Abb. 41).

Beide sowohl mit dem Antikörper gegen den IL-10 Rezeptor als auch mit ConA behandelten Gruppen verzeichneten einen Anstieg der Serum-ALT im Vergleich zu den nur mit ConA behandelten Gruppen, der jedoch nicht signifikant war. Die TNFR1^{MDC-KO} Tiere, die vor ConA-induziertem Schaden geschützt sind, hatten bei zusätzlicher Behandlung mit dem IL-10 Rezeptor Antikörper einen Serum-ALT-Spiegel von im Mittel ca. 2800 IU/L. Bei den TNFR1^{FL} Tieren konnte im Mittel ein Serum-ALT-Wert von ca. 7700 IU/L gemessen werden (Abb. 41). In Folge der zusätzlichen Behandlung mit einem IL-10 Rezeptor Antikörper konnte bei den Tieren, die vor ConA-induziertem Leberschaden geschützt sind, ein nicht-signifikanter Anstieg der Serum-ALT verzeichnet werden.

3.2 Die Rolle von TNFR1 im LPS/Gal Modell des akuten Leberversagens

Für das häufig verwendete Modell des akuten Leberversagens wurde die Wichtigkeit der TNF/TNFR1 Signalachse bereits beschrieben^{84,85}. Der in diesem Modell induzierte Leberschaden wird von der angeborenen Immunantwort mediiert⁸⁷ und findet unabhängig von T-Zellen statt⁷⁴. Die Funktion von TNFR1 in diesem Modell wurde anhand der zuvor generierten konditionellen TNFR1 Knock-Out-Mauslinien untersucht.

3.2.1 Leberparenchym-spezifischer TNFR1 vermittelt das akute Leberversagen im LPS/Gal Modell

Um die Funktion des Parenchym-spezifischen TNFR1 im LPS/Gal Modell des akuten Leberversagens zu untersuchen, wurden TNFR1^{LPC-KO} und deren TNFR1^{FL} Geschwistertiere nacheinander zunächst mit Gal und anschließend mit LPS behandelt (2.2.1) und über einen Zeitraum von 10 h beobachtet. Das Überleben der Tiere wurde als Kaplan-Meier Graph dargestellt (Abb. 42).

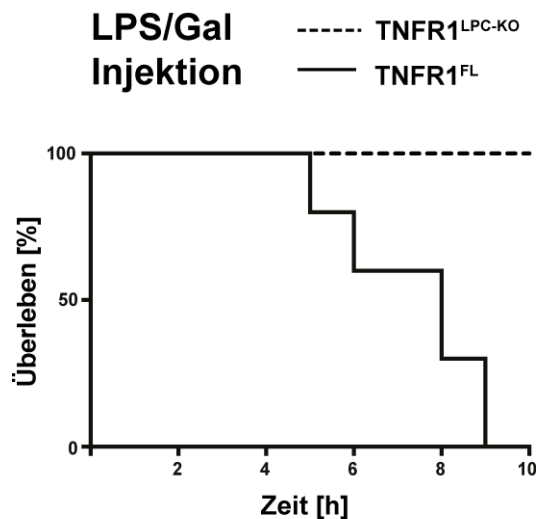


Abb. 42: Überleben der TNFR1^{FL} und TNFR1^{LPC-KO} Gruppe nach Behandlung mit LPS und Gal im Beobachtungszeitraum von 10 h. n = 4; 4.

Aus der Gruppe der TNFR1^{LPC-KO} Tiere ist nach LPS/Gal-Behandlung kein Tier gestorben, während 100 % der Tiere aus der TNFR1^{FL} Gruppe innerhalb von 10 h gestorben sind (Abb. 42). Dies zeigt, dass der Leberschaden in diesem Modell durch den TNFR1 auf den Zellen des Leberparenchyms vermittelt wird. Die überlebende TNFR1^{LPC-KO} Gruppe wurde nach Beenden des Experiments histologisch (2.2.6) und serologisch (2.2.4) auf einen entstandenen Leberschaden untersucht. In einem weiteren Experiment wurden 5 h nach LPS/Gal Behandlung TNFR1^{FL} Tiere analysiert.

In Abbildung 43 sind die Ergebnisse der ALT-Messungen sowie repräsentative Aufnahmen H&E gefärbter Leberschnitte zusammengefasst.

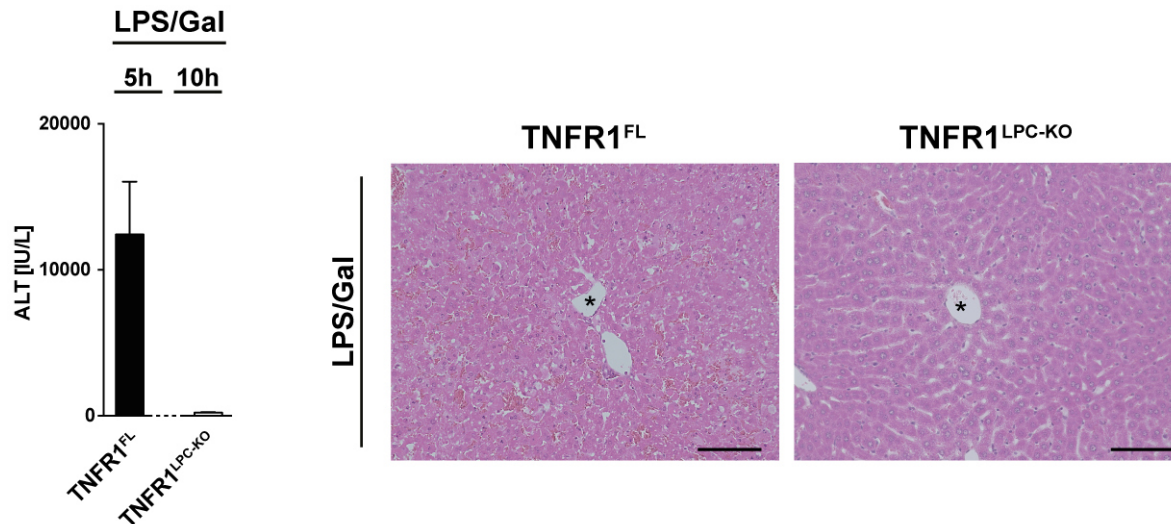


Abb. 43: Serum-ALT-Messung und repräsentative histologische Aufnahmen H&E gefärbter Lebern 5 h (TNFR1^{FL}) oder 10 h (TNFR1^{LPC-KO}) nach LPS/Gal-Injektion. Angaben +/- SEM. n= 4; 4. Balken = 50 µm.

Die Serum-ALT-Werte der TNFR1^{LPC-KO} Gruppe waren mit im Mittel ca. 200 IU/L nicht erhöht und zeigen, dass diese Tiere in Folge der LPS/Gal Behandlung keine Leberentzündung entwickeln. Dies konnte auch histologisch bestätigt werden. In H&E gefärbten Leberpräparaten waren keine geschädigten Areale sichtbar (Abb. 43). Die Serum-ALT-Werte der TNFR1^{FL} Gruppe waren 5 h nach LPS/Gal-Behandlung mit im Mittel ca. 12500 IU/L extrem erhöht und deuten auf ein massives Sterben der Hepatozyten hin. Die histologischen Analysen der Leber zeigten deutliche Blutinfiltrate und bestätigten die Ergebnisse der ALT-Messung (Abb. 43). Diese Untersuchungen beweisen, dass die innerhalb von 10 h verstorbenen Tiere an Leberversagen in Folge der LPS/Gal Behandlung starben.

3.2.2 T-Zell-spezifischer TNFR1 ist entbehrlich im LPS/Gal Modell des akuten Leberversagens

Die Bedeutung des TNFR1 auf den T-Zellen in diesem Modell des akuten Leberversagens wurde ebenfalls untersucht. In diesem Experimentaufbau wurden sowohl die TNFR1^{TC-KO} Gruppe als auch die TNFR1^{FL} Gruppe zunächst mit Gal und anschließend mit LPS behandelt und für 10 h beobachtet (2.2.1). Das Überleben dieser Gruppen wurde als Kaplan-Meier-Graph dargestellt (Abb. 44).

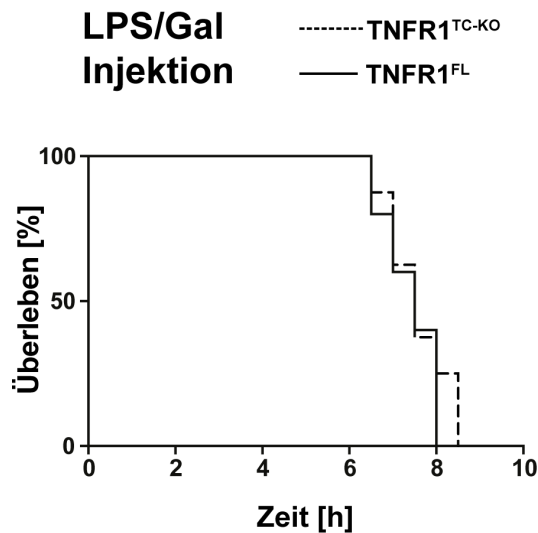


Abb. 44: Überleben der TNFR1^{FL} und TNFR1^{TC-KO} Gruppe nach Behandlung mit LPS und Gal im Beobachtungszeitraum von 10 h. n = 5; 8.

Alle Tiere beider Genotypen starben innerhalb des Beobachtungszeitraumes (Abb. 44). Die T-Zell-spezifische Deletion des TNFR1 birgt keinen Schutz vor akutem Leberversagen in diesem Modell.

3.2.3 Endothelzell-spezifischer TNFR1 ist entbehrlich im LPS/Gal Modell des akuten Leberversagens

Die Funktion des Endothelzell-residenten TNFR1 in dem LPS/Gal Modell des akuten Leberversagens wurde ebenfalls durch die Gal und LPS Behandlung von TNFR1^{EC-KO} und TNFR1^{FL} Tieren analysiert (2.2.1). Das Überleben beider Gruppen wurde als Kaplan-Meier-Graph dargestellt (Abb. 45).

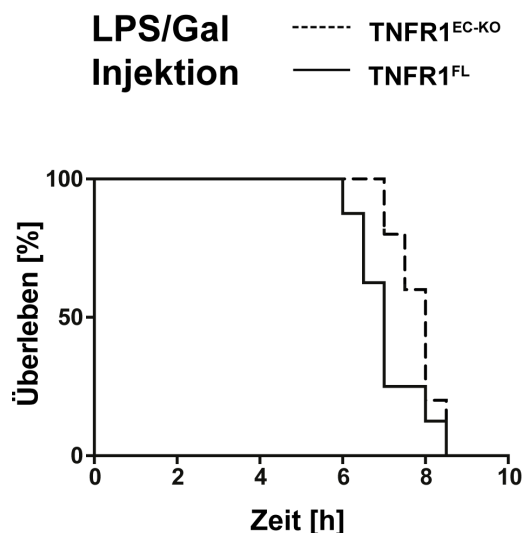


Abb. 45: Überleben der TNFR1^{FL} und TNFR1^{EC-KO} Gruppe nach Behandlung mit LPS und Gal im Beobachtungszeitraum von 10 h. n = 8; 5.

Jeweils alle Tiere beider Gruppen starben innerhalb des 10stündigen Beobachtungszeitraumes (Abb. 45). Dies zeigt, dass der TNFR1 auf den Zellen des Endothels entbehrlich ist bei der Mediierung des Leberschadens in diesem Modell.

3.2.4 TNFR1^{MDC-KO} Tiere sind im LPS/Gal Modell nicht vor akutem Lebersversagen geschützt

Da die TNFR1^{MDC-KO} Tiere im ConA Modell einen kompletten Schutz vor Leberentzündung aufwiesen, wurde die Bedeutung des TNFR1 auf MDCs im zweiten verwendeten Modell der Leberschädigung untersucht. TNFR1^{MDC-KO} Tiere und deren TNFR1^{FL} Geschwisterkontrolltiere wurden zunächst mit Gal, 30 min später mit LPS behandelt (2.2.1) und für 10 h beobachtet. In Abbildung 46 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung graphisch als Kaplan-Meier-Kurve dargestellt.

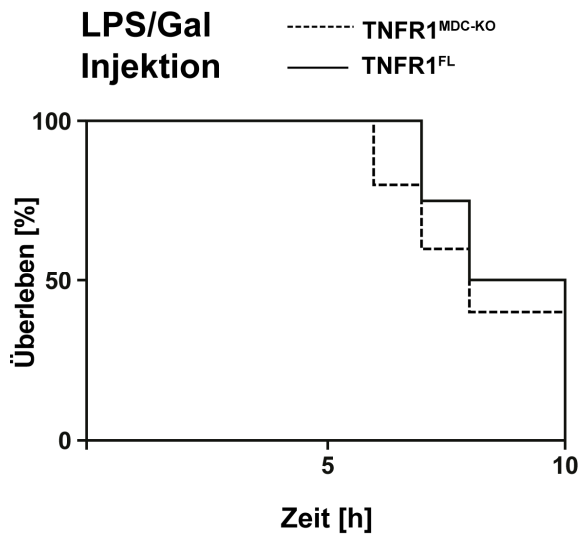


Abb. 46: Überleben der TNFR1^{FL} und TNFR1^{MDC-KO} Gruppe nach Behandlung mit LPS und Gal im Beobachtungszeitraum von 10 h. n = 4; 4.

Es konnte keinen Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen festgestellt werden. Es starben im Beobachtungszeitraum sowohl alle TNFR1^{MDC-KO} als auch alle TNFR1^{FL} Tiere (Abb. 46). Der konditionelle TNFR1 Knock-Out auf MDCs birgt keinen Überlebensvorteil gegenüber den TNFR1^{FL} Kontrolltieren.

3.3 Die Bedeutung von TNFR1 im LPS Modell des septischen Schocks

Die Wichtigkeit der TNF/TNFR1 Signalachse bei der Vermittlung des Leberschadens in Folge einer hohen LPS Dosis ist schon seit langem bekannt. So konnte gezeigt werden, dass TNF essentiell zur Schädigung beiträgt⁹¹⁻⁹³. Es wurde außerdem gezeigt, dass Tiere mit einem kompletten Knock-Out des TNFR1 vor dem LPS-induzierten septischen Schock geschützt sind⁸⁴. Um die TNF/TNFR1 Signalachse besser zu untersuchen wurden die zuvor generierten Mauslinien mit konditionellem TNFR1 Knock-Out in diesem Modell des septischen Schocks analysiert.

3.3.1 TNFR1^{LPC-KO} haben im LPS Modell keinen Überlebensvorteil

Um die TNF/TNFR1 Signalkaskade auf den Zellen des Leberparenchyms in diesem Modell besser zu untersuchen, wurden Tiere beider Gruppen mit einer hohen Dosis LPS behandelt und für 120 h beobachtet. Das Überleben der Tiere wurde als Kaplan-Meier Graph dargestellt (Abb. 47).

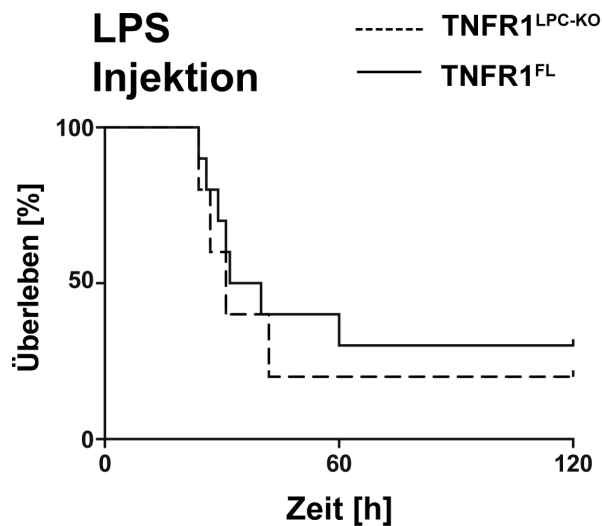


Abb. 47: Überleben der TNFR1^{FL} und TNFR1^{LPC-KO} Gruppe nach Behandlung mit LPS im Beobachtungszeitraum von 120 h. n = 10; 5.

Sowohl aus der TNFR1^{LPC-KO} als auch aus der TNFR1^{FL} Gruppe starben 120 h nach LPS Gabe prozentuell ähnlich viele Tiere, was darauf hindeutet, dass die Leberparenchym-spezifische Deletion des TNFR1 in diesem Modell keinen Überlebensvorteil mit sich bringt.

3.3.2 TNFR1^{TC-KO} haben im LPS Modell keinen Überlebensvorteil

Um die Rolle des TNFR1 auf den T-Zellen zu untersuchen wurden TNFR1^{TC-KO} und TNFR1^{FL} Tiere mit einer hohen, LD₅₀ Dosis LPS behandelt (2.2.1). Beide Gruppen wurden über einen Zeitraum von 120 h beobachtet. Das Überleben beider Gruppen wurde als Kaplan-Meier-Graph dargestellt (Abb. 48).

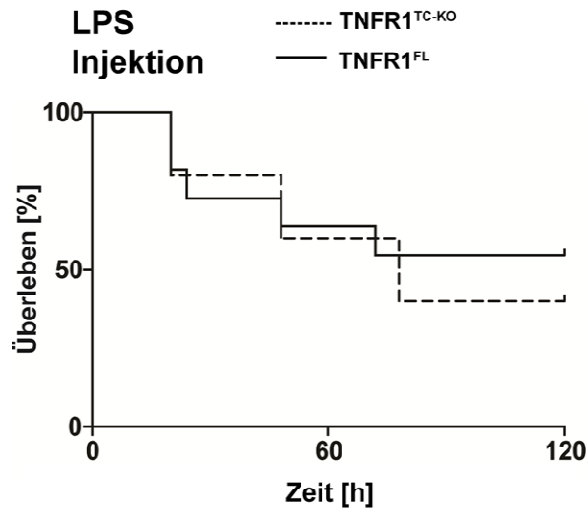


Abb. 48: Überleben der TNFR1^{FL} und TNFR1^{TC-KO} Gruppe nach Behandlung mit LPS im Beobachtungszeitraum von 120 h. n = 5; 11.

Nach Verabreichen der hohen LPS Dosis starben im Beobachtungszeitraum aus beiden Gruppen ca. 50 % der Tiere (Abb. 48). Da prozentuell gleich viele Tiere beider Genotypen starben ist davon auszugehen, dass der T-Zell-residente TNFR1 in diesem Modell keine essentielle Funktion hat.

3.3.3 TNFR1^{EC-KO} haben im LPS Modell keinen Überlebensvorteil

Die Bedeutung des endothelresidenten TNFR1 im LPS Modell wurde in einem Überlebens-Experiment untersucht (2.2.1). Abbildung 49 zeigt die graphisch als Kaplan-Meier-Kurve dargestellten Ergebnisse dieser Untersuchung.

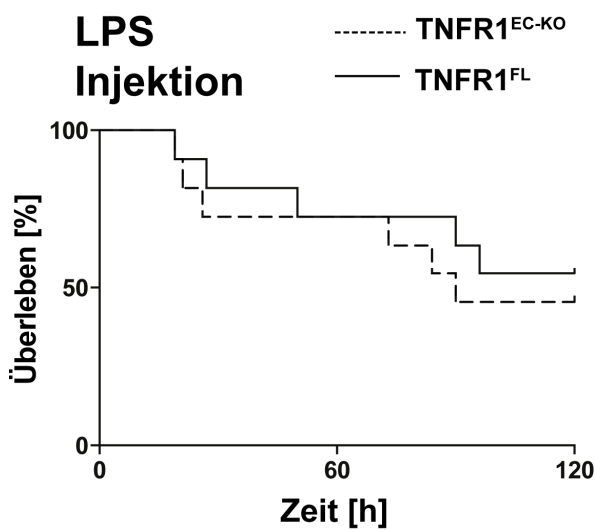


Abb. 49: Überleben der TNFR1^{FL} und TNFR1^{EC-KO} Gruppe nach Behandlung mit LPS im Beobachtungszeitraum von 120 h. n = 11; 11.

Nach Verabreichung der LD₅₀ Dosis LPS wurden TNFR1^{FL} und TNFR1^{EC-KO} Tiere über einen Zeitraum von 120 h beobachtet. Die graphische Darstellung verdeutlicht, dass der endothelspezifische TNFR1

Knock-Out keinen Überlebensvorteil in diesem Modell vermittelt. Es starben im Beobachtungszeitraum ca. 50 % der Tiere beider Gruppen in Folge der LD₅₀ LPS Dosis (Abb. 49).

3.3.4 TNFR1^{MDC-KO} haben im LPS Modell keinen Überlebensvorteil

In einem weiteren Experimentansatz wurde untersucht, ob die Deletion des MDC-spezifischen TNFR1 einen Unterschied in diesem Modell macht. Es wurden sowohl TNFR1^{MDC-KO} als auch TNFR1^{FL} Tiere mit einer LD₅₀ Dosis LPS behandelt und für 120 h beobachtet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden in Abbildung 50 als Kaplan-Meier-Kurve dargestellt.

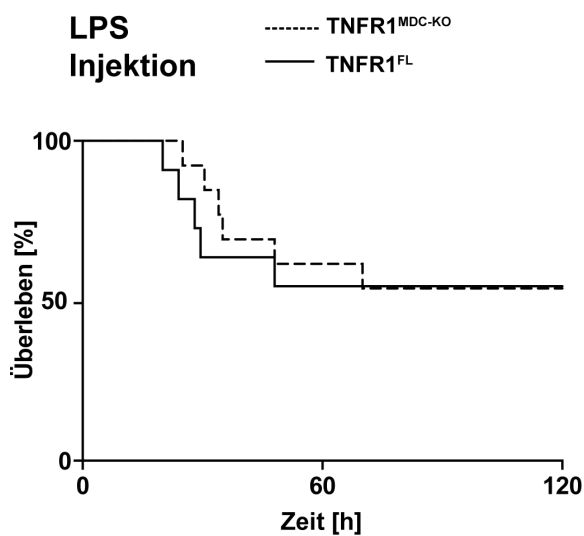


Abb. 50: Überleben der TNFR1^{FL} und TNFR1^{MDC-KO} Gruppe nach Behandlung mit LPS im Beobachtungszeitraum von 120 h. n = 11; 13.

Zwischen beiden untersuchten Gruppen war kein statistisch signifikanter Unterschied erkennbar. Im Beobachtungszeitraum starben prozentuell gleich viele TNFR1^{MDC-KO} und TNFR1^{FL} Tiere (Abb. 50). Dies deutet darauf hin, dass der TNFR1 auf den MDCs für dieses Modell entbehrlich ist.

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Funktion von Todesrezeptoren, vor allem von TNFR1, in immunvermittelten Lebererkrankungen. Todesrezeptoren und deren Liganden sind in vielen immunmedierten Lebererkrankungen von Bedeutung. TNF und TNFR1 sind für den Verlauf vieler Erkrankungen essentiell, die jedoch nur unvollständig verstanden sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die zellspezifische Funktion von TNFR1 in Mausmodellen des Leberschadens untersucht: das Concanavalin A Modell der experimentellen Hepatitis, das Aspekte der autoimmunen Hepatitis aufweist, sowie das LPS/Gal Modell des akuten Leberversagens. Außerdem wurde die Funktion von TNFR1 im LPS Modell des septischen Schocks untersucht.

Für die genaue Analyse der TNF/TNFR1 Signalkaskade wurden Mauslinien generiert, die konditionelle, zellspezifische Deletionen des TNFR1 aufweisen.

Es konnte gezeigt werden, dass TNFR1 verschiedene Arten der Leberentzündung unterschiedlich mediiert. Während im LPS/Gal Modell des akuten Leberversagens, das unabhängig von T-Zellen entsteht, der Leberparenchym-spezifische TNFR1 den Schaden vermittelt, ist der Wirkungsort der TNF/TNFR1 Signalkaskade im T-Zell-abhängigen ConA Modell auf den MDCs. Die Hauptfunde dieses Projekts werden im Folgenden näher diskutiert.

4.1 Leberparenchym-spezifischer TNFR1 mediiert den Leberschaden im LPS/Gal aber nicht im Concanavalin A Modell

Das Concanavalin A Modell ist ein sehr häufig verwendetes Modell der experimentellen Hepatitis. Die einmalige Injektion des Pflanzenlektins ConA induziert in geeigneter Dosis innerhalb von 8 h eine schwere Hepatitis bis hin zum Leberversagen. Für die Entstehung des Leberschadens sind unterschiedliche Zelltypen notwendig. Die Tatsache, dass Tiere, die keine T-Zellen besitzen, vor Leberentzündung geschützt sind, zeigt, dass der ConA-induzierte Leberschaden T-Zell-abhängig ist^{72,73}. Die kritische Bedeutung des proinflammatorischen Zytokins TNF wurde erkannt, da TNF Knock-Out Mäuse vor Leberschaden geschützt waren^{77,78}. Zudem konnte gezeigt werden, dass der systemische Knock-Out des TNFR1 vor Leberschädigung schützt. In Experimenten mit zellspezifischer Deletion von TNF wurde nachgewiesen, dass das Zytokin sowohl aus Makrophagen als auch aus T-Zellen freigesetzt wurde⁷⁹. Die kritische Funktion des TNFR1 und TNF ist demnach bekannt. Die entscheidende Ziel-Zelle ist jedoch ebenso ungeklärt wie der Wirkungsmechanismus. Es wurde jedoch vorgeschlagen, dass die Bindung von TNF an den TNFR1 direkt auf den Zellen des Leberparenchyms zum Zelltod führt^{45,77,80,81}.

Die Bindung von TNF an TNFR1 hat die Initiierung einer komplexen Signalkaskade zur Folge, die entweder zum Tod oder zum Überleben der Zelle führen kann^{39,49}. Für Aktivierung des Apoptose-Signalwegs ist das Adaptorprotein FADD unabdingbar^{43,53}.

Um den genauen Wirkungsort von TNF im ConA Modell zu spezifizieren, wurden Tiere, die eine Leberparenchym-spezifische Deletion des Adaptorproteins FADD aufweisen in diesem Kontext untersucht (Deletion von FADD spezifisch in Hepatozyten und Cholangiozyten). Es wurde bereits gezeigt, dass das Fehlen dieses Proteins bei gleichzeitiger Inhibierung des NF- κ B-Signalwegs, die Leber vor Apoptose schützt⁵². Wenn TNF direkt an den TNFR1 des Leberparenchyms bindet und so den Leberschaden im ConA Modell induziert, sollten FADD^{LPC-KO} Tiere einen Schutz der Leber aufweisen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen waren überraschend: Die FADD^{LPC-KO} Tiere entwickelten einen genauso schweren Leberschaden wie die Kontrolltiere.

Die Tatsache, dass FADD^{LPC-KO} Tiere nicht vor ConA induziertem Schaden geschützt sind, führte zu folgenden Hypothesen:

1. Die Funktion des TNFR1 ist zwar Leberparenchym-abhängig aber unabhängig von FADD
oder
2. Der Wirkungsort der TNF/TNFR1 Signalachse ist in diesem Modell nicht direkt auf den Zellen des Leberparenchyms sondern auf anderen Zellen

Um diese Hypothesen zu überprüfen wurden zunächst Tiere generiert, die eine Leberparenchym-spezifische Deletion des TNFR1 aufweisen. Serum-Untersuchungen und histologische Analysen zeigten, dass die Tiere *per se* keine Leberentzündung aufweisen. Die TNFR1^{LPC-KO} Tiere wurden im Modell der T-Zell vermittelten Hepatitis untersucht und zeigten keinen Schutz vor ConA-induziertem Leberschaden. Dies beweist, dass der Leberschaden im ConA Modell nicht durch Leberparenchym-intrinsischen TNFR1 entsteht. Somit ist die erste Hypothese widerlegt.

Im Kontext der ConA-induzierten Hepatitis wurde nicht nur TNF sondern auch die Liganden der Todesrezeptoren Fas und TRAILR als kritisch beschrieben. Es wurde zum Beispiel gezeigt, dass TRAIL^{-/-} Tiere einen relativen Schutz vor Leberentzündung aufweisen¹¹⁵. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die eine Depletion des Fas-Liganden aufweisen, resistent gegenüber ConA-induziertem Leberschaden sind¹¹⁶. Ob die Parenchym-spezifischen Todesrezeptoren Fas und TRAILR bei der Induktion des Leberschadens in diesem Modell eine wichtige Bedeutung haben, konnte mit Hilfe konditioneller Knock-Out Mäusen untersucht werden. 3DR^{LPC-KO} Tiere weisen zusätzlich zu der Deletion von TNFR1 auch einen spezifischen Knock-Out der Todesrezeptoren Fas und TRAILR auf. Da die Parenchym-spezifische Deletion weder von FADD noch von TNFR1 einen Schutz vor ConA-induziertem Leberschaden mit sich brachte, war davon auszugehen, dass die Parenchym-spezifische

Deletion der drei Todesrezeptoren TNFR1, Fas und TRAILR ebenfalls nicht vor Leberschaden in diesem Modell schützt. Tatsächlich entwickelten ConA-behandelte 3DR^{LPC-KO} Tiere einen Leberschaden, der sich statistisch nicht signifikant von dem der Kontrollgruppe unterschied. Es konnte somit gezeigt werden, dass neben TNFR1 auch die Leberparenchym-spezifischen Todesrezeptoren Fas und TRAILR nicht für den ConA-vermittelten Leberschaden verantwortlich sind. Todesrezeptoren auf den Parenchymzellen der Leber sind in diesem Modell für den Zelltod, der direkt durch Todesliganden vermittelt wird, nicht essentiell. Die Ergebnisse unterstreichen die Wichtigkeit eines Effektorsystems, das unabhängig von Todesliganden funktioniert, wie zum Beispiel der Perforin-induzierte Zelltod^{117,118} oder eine Nekrose der Parenchymzellen, die durch Störungen der Mikrozirkulation entsteht¹¹⁹.

Die zum Leberversagen führende Schädigung im LPS/Gal Modell ist ebenfalls von TNF und TNFR1 mediiert^{84,85}. Der Leberschaden erfolgt jedoch unabhängig von T-Zellen⁷⁴. Das Modell der Pathogenese geht von der initialen Bindung des LPS an den TLR4 auf den leberresidenten Makrophagen aus. In Folge dieser Bindung sezernieren die Makrophagen TNF, das an den TNFR1 bindet und entweder zu pro- oder antiapoptotischen Signalkaskaden führt^{49,87}. Die zusätzliche Gabe des Transkriptionshemmers Gal führt zur Inhibierung der transkriptionsabhängigen antiapoptotischen Signalkaskade^{82,83}.

Um den genauen Wirkungsort des TNF zu ermitteln, wurden in diesem Kontext TNFR1^{LPC-KO} Tiere untersucht. In einem Überlebens-Experiment konnte gezeigt werden, dass die Leberparenchym-spezifische Deletion des TNFR1 zum kompletten Schutz vor LPS/Gal-induzierten Schädigung der Leber führt. Innerhalb von 10 h nach Behandlung starben alle Tiere der Kontrollgruppe während alle Tiere der TNFR1^{LPC-KO} Gruppe überlebten. Um diesen Leberschaden genauer zu untersuchen wurden von Tieren beider Gruppen Serum-ALT- und histologische Analysen durchgeführt. Diese Untersuchungen zeigten, dass die TNFR1^{FL} Gruppe in Folge der Behandlung sehr hohe Serum-ALT-Werte entwickelte. Die histologischen Untersuchungen dieser Lebern zeigten viele Infiltrate und massive Entzündung, vereinbar mit einem Leberversagen. Die TNFR1^{LPC-KO} Gruppe entwickelte in Folge der Behandlung keine hohen Serum-ALT-Werte und keine histologischen Auffälligkeiten, was den Schutz vor Leberschädigung bestätigt.

Das LPS Modell des septischen Schocks ist ebenfalls ein TNF-abhängiges Modell⁹¹⁻⁹³. Es ist bekannt, dass ein systemischer Knock-Out des TNFR1 zum Schutz in diesem Modell führt⁸⁴.

Es konnte gezeigt werden, dass die Leberparenchym-spezifische Deletion des TNFR1 keinen Überlebensvorteil in diesem Modell des septischen Schocks birgt. Innerhalb des Beobachtungszeitraumes starben genauso viele Tiere der TNFR1^{LPC-KO} Gruppe wie auch der TNFR1^{FL}

Kontrollgruppe. Während TNFR1^{LPC-KO} Tiere im LPS/Gal Modell geschützt waren, konnte gezeigt werden, dass dieser Knock-Out im Falle einer hohen Dosis LPS keinen Vorteil mit sich bringt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der Leberparenchym-residente TNFR1 den Leberschaden im LPS/Gal Modell des akuten Leberversagens aber nicht im ConA Modell der T-Zell vermittelten Hepatitis mediiert. Es konnte gezeigt werden, dass der ConA-induzierte Leberschaden nicht durch die Bindung von TNF an den TNFR1 direkt auf den Zellen des Parenchyms entsteht sondern, dass der Wirkungsort des TNF eine andere Zellsorte sein muss. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Wirkungsort des TNF im LPS/Gal Modell der TNFR1 auf den Zellen des Leberparenchyms ist.

4.2 T-Zell- und Endothelzell-residenter TNFR1 ist entbehrlich für die Entstehung des Leberschadens in den untersuchten Modellen der experimentellen Hepatitis

Die ConA-induzierte Hepatitis kann nur in Anwesenheit von T-Lymphozyten entstehen, was mit entsprechenden Depletionsexperimenten und Knock-Out Tieren gezeigt wurde⁷². Zudem wurden T-Zellen neben Makrophagen als eine der Quellen für die Sezernierung von TNF identifiziert⁷⁹. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine Depletion der leberresidenten NKT-Zellen zum Schutz der Leber vor Entzündung führt¹⁰⁶.

Da die T-Lymphozyten in diesem Modell eine entscheidende Funktion übernehmen, sollte untersucht werden, ob diese Zellen den Wirkungsort von TNF darstellen. Hierfür wurden durch Kreuzung Mäuse generiert, die eine zellspezifische Deletion des TNFR1 auf allen T-Lymphozyten aufweisen¹⁰². Da im Laufe der T-Zell-Entwicklung sowohl zytotoxische T-Zellen als auch T-Helferzellen und NKT-Zellen CD4 positiv sind, werden prinzipiell alle T-Lymphozyten von der Expression der Cre-Rekombinase betroffen.

Die so entstandenen Tiere (TNFR1^{TC-KO}) wurden zunächst auf eine eventuell bestehende Entzündung der Leber im unbehandelten Zustand untersucht. Sowohl junge als auch alte Tiere zeigten keine Auffälligkeiten oder Hinweise auf eine vorhandene Entzündung.

Der nach ConA-Injektion entstandene Leberschaden sowie die Länge der Milz unterschieden sich nicht signifikant in der Gruppe der TNFR1^{TC-KO} Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass die T-Zell-spezifische Deletion des TNFR1 keinen Schutz vor ConA-induziertem Leberschaden mit sich bringt.

Die Untersuchung der TNFR1^{TC-KO} Gruppe im Modell des LPS/Gal-induzierten Leberversagens zeigte keinen Überlebensvorteil gegenüber der TNFR1^{FL} Kontrollgruppe. Im Beobachtungszeitraum starben sowohl alle Tiere der TNFR1^{TC-KO} als auch alle Tiere der TNFR1^{FL} Gruppe. Es konnte auch kein zeitlicher Unterschied in der Sterberate zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden.

Um herauszufinden, ob der Wirkungsort von TNF im LPS Modell des septischen Schocks der TNFR1 auf den T-Lymphozyten ist, wurden die TNFR1^{TC-KO} und die TNFR1^{FL} Kontrolltiere nach einer hohen LPS-Dosis beobachtet. Es konnte kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden: Im Beobachtungszeitraum starben genauso viele Tiere der TNFR1^{TC-KO} und der TNFR1^{FL} Gruppe. Für dieses Modell des septischen Schocks ist der TNFR1 auf T-Lymphozyten nicht kritisch.

Endothelzellen fungieren als Barriere des Parenchyms und regulieren das Passieren von Molekülen und Zellen. Im Rahmen der ConA-induzierten Hepatitis wurden die Endothelzellen als Mediatoren der Koagulation beschrieben¹¹⁹. Um zu überprüfen, ob der Wirkungsort des TNF im ConA-induzierten Leberschaden der TNFR1 auf den Endothelzellen ist, wurden Tiere generiert, die eine Endothel-spezifische Deletion des TNFR1 aufweisen (TNFR1^{EC-KO}). Sowohl junge, als auch alte Tiere waren im unbehandelten Zustand frei von relevanter Leberschädigung. Unter ConA-Behandlung fanden sich zwischen den Tieren, die TNFR1 spezifisch in Endothelzellen deletieren und den entsprechenden Kontrollen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten, dass die Endothel-spezifische Deletion des TNFR1 keinen Schutz vor ConA-induzierter Leberentzündung mit sich bringt. Der Wirkungsort des TNF ist in diesem Modell nicht der TNFR1 auf den Endothelzellen.

Es wurde auch untersucht ob der Endothel-spezifische TNFR1 eine essentielle Funktion im LPS/Gal Modell des akuten Leberversagens und im LPS Modell des septischen Schocks hat. TNFR1^{EC-KO} Tiere hatten weder im LPS/Gal noch im LPS Modell einen Überlebensvorteil gegenüber der Kontrollgruppe.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sowohl die ConA-induzierte Hepatitis als auch der LPS/Gal induzierte Leberschaden nicht durch den Endothel- oder den T-Zell-spezifischen TNFR1 vermittelt werden. Ebenfalls waren sowohl der T-Zell- als auch der Endothelzell-spezifische TNFR1 im LPS Modell entbehrlich.

4.3 TNFR1 auf MDCs vermittelt die Entstehung des Leberschadens im Concanavalin A Modell während es im LPS/Gal und im LPS Modell nicht von Bedeutung ist

Makrophagen sind wichtige Mediatoren des ConA-induzierten Leberschadens. Es wurde gezeigt, dass sie von kritischer Bedeutung sind, denn eine Depletion der Makrophagen schützt vor einer Schädigung der Leber^{72,120}. Interessanterweise wurden Makrophagen jedoch zusammen mit den T-Lymphozyten auch als Quelle für TNF identifiziert⁷⁹. Neutrophilen Granulozyten wurde ebenfalls eine kritische Bedeutung im Modell der T-Zell medierten Hepatitis zugeschrieben. Diese Zellen wandern in kurzer Zeit nach ConA-Injektion in die Leber ein und helfen bei der Rekrutierung anderer Zellen wie CD4⁺ T-Lymphozyten¹⁰⁶. Eine Depletion der neutrophilen Granulozyten führt zum Schutz vor Hepatitis¹⁰⁶.

Diese Erkenntnisse unterstreichen die Wichtigkeit dieser Zellen in der Entstehung des ConA-induzierten Leberschadens, sodass Makrophagen und neutrophile Granulozyten als Wirkungsort des TNF möglich erscheinen.

Um diese Hypothese zu überprüfen wurden durch Kreuzung der Linien TNFR1^{FL} und LysM Cre Mäuse generiert, die einen konditionellen Knock-Out des TNFR1 auf Makrophagen und neutrophilen Granulozyten aufweisen (TNFR1^{MDC-KO})^{100,104}. Junge wie auch alte Tiere zeigten im unbehandelten Zustand keine Leberentzündung.

In Folge der ConA-Behandlung zeigten die TNFR1^{MDC-KO} Tiere einen kompletten Schutz vor Leberentzündung, während die TNFR1^{FL} Kontrollgruppe eine fulminante Hepatitis entwickelte. Der Serum-ALT-Spiegel der TNFR1^{MDC-KO} Gruppe unterschied sich nicht signifikant von dem der PBS behandelten Kontrollgruppe. Histologische Analysen der Leber bestätigten dieses Ergebnis: Während die TNFR1^{FL} Gruppe deutliche Leberschädigung aufwies, zeigte sich bei der TNFR1^{MDC-KO} Gruppe ein kompletter Schutz vor Hepatitis.

Im Kontext der ConA-induzierten Hepatitis konnte bei allen erkrankten Tieren auch eine Vergrößerung der Milz beobachtet werden. Sowohl bei TNFR1^{LPC-KO} als auch bei TNFR1^{TC-KO} und TNFR1^{EC-KO} Tieren vergrößerte sich die Milz signifikant im Vergleich zu den PBS-Kontrollen.

Untersuchungen der Milzlänge der TNFR1^{MDC-KO} Tiere zeigten einen Trend, der jedoch nicht signifikant ist: Bei der vor Leberentzündung geschützten TNFR1^{MDC-KO} Gruppe vergrößerte die Milz sich etwas weniger als bei der TNFR1^{FL} Gruppe, jedoch konnte in beiden ConA-behandelten Gruppen ein signifikanter Anstieg der Milzlänge im Vergleich zu den PBS behandelten Gruppen verzeichnet werden. Die Vergrößerung der Milz deutet darauf hin, dass trotz des fehlenden Leberschadens eine Reaktion als Antwort auf die ConA-Gabe stattfindet. Es könnte sich um eine Proliferation oder Rekrutierung verschiedener Zellen handeln oder die Folge eines Blutstaus oder einer Einblutung sein.

Die Ergebnisse der Messung des Serum-ALT-Spiegels zu verschiedenen Zeitpunkten nach ConA Injektion verdeutlichten den Schutz der TNFR1^{MDC-KO} Gruppe. Während vor und 2 h nach ConA Behandlung sich der Wert zwischen beiden Gruppen nicht unterschied, konnte im Serum der TNFR1^{FL} Tiere ab ca. 4 h nach ConA-Gabe ein erhöhter ALT-Spiegel gemessen werden, der im Verlauf kontinuierlich anstieg. Der Serum-ALT-Spiegel der geschützten TNFR1^{MDC-KO} Gruppe blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum im niedrigen Bereich (im Mittel kleiner als 200 IU/L). Da erhöhte Serum-ALT-Werte durch geschädigte und zerstörte Hepatozyten entstehen, ist davon auszugehen, dass die TNFR1^{FL} Gruppe ca. 6 h nach ConA-Behandlung bereits eine ausgeprägte Hepatitis entwickelt hatte, die sich bis zum letzten Messpunkt, 8 h nach ConA-Gabe, deutlich aggraviert hatte.

Für die Pathogenese des ConA-induzierten Leberschadens wurden neben TNF auch andere Zytokine als wesentlich beschrieben. Um den Schutz vor Leberschädigung besser zu charakterisieren wurde die Serum-Konzentration der Zytokine zu verschiedenen Zeitpunkten nach ConA-Injektion gemessen. TNF^{77,78} konnte zu allen gemessenen Zeitpunkten in gleicher Menge im Serum sowohl der geschützten TNFR1^{MDC-KO} Gruppe als auch der TNFR1^{FL} Kontrollgruppe detektiert werden. Auch war die im Serum gemessene Konzentration an IFN γ in beiden Gruppen statistisch nicht signifikant unterschiedlich. Die Untersuchung anderer pro- und antiinflammatorischer Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-4 ergab zu keinem Zeitpunkt vor und nach ConA-Behandlung einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Die antiinflammatorische Wirkung des Zytokins IL-10 wurde im Kontext der ConA-Hepatitis bereits beschrieben. IL-10 depletierte Tiere entwickelten eine stärkere Hepatitis als die Kontrolltiere. Tiere, die mit IL-10 vorbehandelt wurden, waren im ConA Modell vor einer Leberentzündung relativ geschützt¹¹². In Folge von ELISA-Messungen der Serum-Konzentration des Zytokins IL-10 konnte nach ConA-Behandlung zu mehreren Zeitpunkten ein Unterschied zwischen der TNFR1^{MDC-KO} und der TNFR1^{FL} Gruppe festgestellt werden, der jedoch jeweils statistisch nicht signifikant war. Die vor Leberentzündung geschützten TNFR1^{MDC-KO} Tiere hatten höhere Serum-IL-10-Konzentrationen als die TNFR1^{FL} Tiere. Da dem Zytokin IL-10 sowohl in der ConA-induzierten Hepatitis¹¹², als auch in anderen immunvermittelten Erkrankungen¹²¹ eine protektive Funktion zugeschrieben wird, sollte untersucht werden, ob eine Blockade der IL-10/IL-10-Rezeptor Signalachse einen Einfluss auf den Schutz der TNFR1^{MDC-KO} Tiere hat. In Folge der α IL-10-Rezeptor-Vorbehandlung entwickelte die TNFR1^{MDC-KO} Gruppe einen ConA-induzierten Leberschaden. Für die TNFR1^{MDC-KO} Gruppe konnten nach der Doppelbehandlung deutlich höhere Serum-ALT-Werte als nach der alleinigen ConA-Injektion, die in diesen Tieren keinen Leberschaden induzierte, gemessen werden. Die Serum-ALT-Konzentration war jedoch deutlich kleiner als die Serum-ALT-Konzentration der lediglich mit ConA behandelten TNFR1^{FL} Kontrolltiere. Diese Ergebnisse könnte bedeuten, dass die IL-10 Produktion in Abhängigkeit von

TNFR1 gehemmt wird. Es wurde bisher jedoch nur publiziert, dass IL-10 TNFR-abhängig freigesetzt wird¹¹². Eine andere Möglichkeit wäre, dass – unabhängig von TNFR1 – IL-10 für ConA-bedingten Leberschaden sensitiviert; die weitere TNFR1-abhängige Pathogenese und der daraus resultierende Unterschied zwischen TNFR1^{MDC-KO} und TNFR1^{FL} bliebe jedoch bestehen. Ob tatsächlich ein kausaler Zusammenhang für die unter fehlendem TNFR1 beobachtete erhöhte IL-10 Freisetzung besteht, müsste in weiteren Experimenten mit einer höheren Anzahl an Tieren und mit unterschiedlichen αIL-10-Rezeptor Konzentrationen untersucht werden. Zusätzlich könnte dieser Zusammenhang mit Hilfe von IL-10-Rezeptor Knock-Out Tieren, bzw. IL-10/TNFR1 Doppel-Knock-Out Tieren, untersucht werden.

Das et al. fanden heraus, dass im ConA Modell der akuten experimentellen Hepatitis TNF JNK-abhängig sezerniert wird⁶⁰. Die Experimente wurden mit MX1 Cre transgenen Tieren durchgeführt. Die wesentlichen Zell-Populationen, in denen Mx1 Cre und LysM Cre deletieren, überlappen sich (Makrophagen und (neutrophile) Granulozyten). Die hier durchgeführten Experimente, die mit LysM Cre transgenen Mäusen durchgeführt wurden, zeigten, dass der TNFR1 auf MDCs für die Entwicklung des Leberschadens essentiell ist und dass es der Wirkungsort von TNF ist. Diese Daten stehen in keinem Widerspruch zueinander. Die Tatsache, dass kein Unterschied in der Serum-TNF-Konzentration in geschützten und Kontrolltieren gemessen werden konnte, könnte folgendermaßen interpretiert werden: TNF würde demnach in Folge der ConA-Gabe von MDCs produziert⁶⁰ und könnte anschließend an den TNFR1 auf (anderen Subtypen der) Makrophagen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten binden. Dieser Vorschlag ließe sich mit dem kürzlich vorgestellten Konzept eines Zusammenspiels verschiedener Makrophagen-Typen für die Eliminierung einer bakteriellen Infektion vereinbaren^{114,122}. Schiwon et al. zeigten, dass der TNFR(1/2) auf Zellen die aus dem Knochenmark stammen und vor allem auf Makrophagen eine entscheidende Funktion in der Abwehr von Bakterien hat¹¹⁴. Es wurde vorgeschlagen, dass residente (Ly6C⁻) Makrophagen die bakterielle Infektion wahrnehmen und Chemokine (unter anderem CCL2) produzieren, die inflammatorische (Ly6C⁺) Makrophagen rekrutieren. Inflammatorische Makrophagen produzieren in Folge dessen TNF, das die residenten Makrophagen zur Freisetzung des Chemokins CXCL2 anregt. CXCL2 wirkt chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten, die nun ebenfalls rekrutiert werden. CXCL2 induziert in neutrophilen Granulozyten die Produktion der Matrix-Metalloprotease 9 (MMP-9), die die Epithelmembran degradiert¹²³ und den Zellen die Einwanderung ermöglicht¹¹⁴. Übertragen auf das Modell der ConA-induzierten Hepatitis würde dies bedeuten, dass Leber-residente Makrophagen in Folge der ConA-Behandlung zunächst CCL2 produzieren und dadurch inflammatorische Makrophagen rekrutieren. Die inflammatorischen Makrophagen produzieren anschließend TNF, worauf die residenten Makrophagen CXCL2 sezernieren. In Folge dessen werden neutrophile

Granulozyten rekrutiert, die den Leberschaden induzieren. In der TNFR1^{MDC-KO} Gruppe konnte 2 und 4 h nach ConA-Behandlung eine signifikant geringere mRNA-Expression des Chemokins CCL2 festgestellt werden. Dieser Unterschied war nach 6 h immer noch deutlich sichtbar. Da die mRNA Menge dieses Chemokins in unbehandelten Tieren beider Gruppen gleich war, ist davon auszugehen, dass in Folge der ConA-Behandlung, die geschützte TNFR1^{MDC-KO} Gruppe bedingt durch die spezifische Deletion weniger CCL2 exprimiert. Analog zum Modell der Blasenentzündung durch Infektion mit *E. coli*¹¹⁴ könnte in der Folge des Fehlens von TNFR1 auf Makrophagen eine verminderte CCL2 Freisetzung resultieren und damit aufgrund eines verminderten CXCL2-Gradienten die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten gestört sein. Interessanterweise fand sich jedoch anders als für die Blaseninfektion mit *E. coli* beschrieben zu keinem Zeitpunkt ein relevanter Unterschied in der Serumkonzentration von CXCL2 zwischen TNFR1^{MDC-KO} und den Kontrolltieren. Zudem war die Anzahl an neutrophilen Granulozyten oder Makrophagen in der Leber stets vergleichbar hoch. Auch die Anzahl Ly6C⁻ (residenter) und Ly6C⁺ (inflammatorischer) Makrophagen war zu verschiedenen Zeitpunkten nach der ConA-Injektion zwischen TNFR1^{MDC-KO} und TNFR1^{FL} Tieren nicht relevant verschieden und die Zahl an F4/80⁺ Makrophagen in der Leber 8 h nach ConA Injektion zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der TNFR1^{MDC-KO} und der TNFR1^{FL} Gruppe.

Zusammengefasst legen die Daten nahe, dass der Ablauf der Entzündungsreaktion im Modell des ConA-induzierten Leberschadens ein anderer ist als im von Schiwon et al. vorgeschlagenen Modell der bakteriellen Infektion. Jedoch könnte in beiden Modellen TNF über den TNFR1 einer Makrophagensubpopulation dazu führen, dass weitere Entzündungszellen aktiviert werden. Die vor Leberschaden geschützte TNFR1^{MDC-KO} Gruppe produziert weniger CCL2 als die Kontrollgruppe, was aber interessanterweise keinen relevanten Einfluss auf die Chemotaxis inflammatorischer Makrophagen zu haben scheint. Die inflammatorischen Makrophagen würden TNF produzieren und so die Produktion von CXCL2 durch die residenten Makrophagen induzieren. Anschließend wandern neutrophile Granulozyten in die Leber ein. Der weitere Ablauf der Entzündungsreaktion scheint sich von dem vorgeschlagenen Konzept zu unterscheiden.

Es fand sich zudem zu keinem der untersuchten Zeitpunkte ein relevanter Unterschied zwischen TNFR1^{MDC-KO} und den Kontrolltieren in der Anzahl der Leukozyten, Thrombozyten, Monozyten, Lymphozyten oder eosinophilen Granulozyten im Blut. Im Blut der unbehandelten TNFR1^{MDC-KO} Gruppe befanden sich signifikant mehr neutrophile Granulozyten als im Blut der unbehandelten TNFR1^{FL} Kontrolltiere. Dieser Unterschied verschwand in Folge der ConA-Injektion. Bereits 2 h nach ConA-Gabe stieg die Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Blut der TNFR1^{FL} Gruppe und erreichte 4 h nach Induktion den Wert der TNFR1^{MDC-KO} Gruppe. Die Deletion des TNFR1 auf neutrophilen

Granulozyten scheint keinen Einfluss auf die im Blut *per se* vorhandene Anzahl dieser Zellen zu haben.

In Folge der ConA-Injektion konnte in der vor Leberentzündung geschützten TNFR1^{MDC-KO} Gruppe eine geringere jedoch statistisch nicht signifikante mRNA-Expression von CXCL1 und CXCL9 festgestellt werden. CXCL1 vermittelt die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten^{124,125} während CXCL9 von Makrophagen produziert wird und die Chemotaxis von T-Zellen beeinflusst^{126,127}. Dieser Trend könnte auf den Einfluss der TNFR1 Deletion auf die Chemotaxis und der Chemokin-Produktion von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten hinweisen. Da durch die TNFR1 Deletion tendenziell weniger CXCL1 produziert wird, scheinen die Zellen die Aktivierung durch die TNF/TNFR1 Bindung für die Produktion des Chemokins zu benötigen. Durch die geringere CXCL1 Konzentration würden auch weniger neutrophile Granulozyten angezogen werden. Es konnten jedoch zu keinem Zeitpunkt weniger neutrophile Granulozyten in der TNFR1^{MDC-KO} Gruppe als in der TNFR1^{FL} Gruppe gezählt werden. Selbiges würde für CXCL9 gelten: die Makrophagen scheinen die TNF/TNFR1 Bindung zu benötigen, um das Chemokin zu produzieren. Eine geringere CXCL9 Konzentration würde die Einwanderung von T-Zellen negativ beeinflussen. Da der Leberschaden im ConA Modell von T-Zellen abhängt¹²⁰, könnten diese unmittelbar an den Zelltod beteiligt sein. Wenn weniger T-Lymphozyten in das Lebergewebe einwandern, würde das die Entstehung des Leberschadens beeinflussen. Um herauszufinden, ob bei TNFR1^{MDC-KO} Tieren in Folge der ConA-Behandlung tatsächlich weniger T-Lymphozyten einwandern, müsste die Anzahl an T-Zellen im Lebergewebe durchflusszytometrisch und histologisch bestimmt werden.

Ebenfalls wurde im Lebergewebe die mRNA Menge anderer Chemokinen zu verschiedenen Zeitpunkten nach ConA-Gabe bestimmt. Bei der Messung der Chemokine CXCL10, CXCL16, CCL20 und TGFβ konnte zwischen den beiden Gruppen über die verschiedenen Zeitpunkte hinweg kein Unterschied in der vorhandenen mRNA Menge festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass diese Chemokine nicht in unterschiedlicher Menge exprimiert werden und, dass die von ihnen medierte Signale nicht an der Schutzentwicklung der TNFR1^{MDC-KO} Gruppe beteiligt sind.

Eine Aufklärung des Ablaufs der Entzündungsreaktion könnte durch weitere Experimente erfolgen bei denen man durch Cre-Rekombinasen weitere konditionelle TNFR1 Knock-Out Tiere generieren würde, um den Wirkungsort des TNF genauer zu spezifizieren. Da von der Deletion durch LysM Cre zusätzlich zu Makrophagen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten auch einige Mastzellpopulationen, einige Populationen der dendritischen Zellen und auch eosinophile und basophile Granulozyten betroffen sind¹⁰⁴, soll der genaue Wirkungsort von TNF durch Transfer-

Experimente eingegrenzt werden. So würden TNFR1^{MDC-KO} Tieren wildtypische Zellen der von der Deletion betroffenen Populationen transferiert werden.

TNF ist ein entscheidender Faktor in mehreren experimentellen Formen der Hepatitis, wie ConA-induzierte oder LPS/Gal-induzierte Hepatitis. Ausgehend von den erzielten Ergebnissen, dass die Vorbehandlung mit dem Transkriptionshemmer Gal TNFR1^{LPC-KO} Tiere gegenüber LPS sensitiviert hat, war davon auszugehen, dass in Folge einer Gal-Vorbehandlung die zuvor geschützten TNFR1^{MDC-KO} Tiere einen ConA-induzierten Schaden entwickeln würden. Erwartungsgemäß starben im Beobachtungszeitraum alle Tiere sowohl aus der TNFR1^{MDC-KO} als auch aus der TNFR1^{FL} Gruppe. Untersuchungen zeigten, dass die zuvor geschützten TNFR1^{MDC-KO} Tiere in Folge der Gal-Vorbehandlung einen Leberschaden entwickeln. Der Serum-ALT-Spiegel der Gal/ConA behandelten Tiere war höher als der der lediglich mit Gal behandelten Gruppe, was zeigt, dass der gemessene Leberschaden durch ConA entstanden ist. Die Ergebnisse unterstreichen, dass TNF, in Abhängigkeit vom Modell der induzierten Hepatitis, verschiedene Wirkungsorte hat. Die Daten sprechen dafür, dass für den direkt durch TNFR1 vermittelten Zelltod des Leberparenchyms der Überlebenssignalweg/Anti-Apoptose-Signalweg unterdrückt werden muss. Dies kann in der Form von Vorbehandlung mit Gal erfolgen oder durch Inhibition oder Deletion von NF-κB geschehen.

Es wurde zudem die Funktion des TNFR1 auf MDCs in den beiden anderen verwendeten Modellen analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die TNFR1^{MDC-KO} Tiere in diesen Modellen keinen Überlebensvorteil haben und, dass das LPS/Gal-induzierte Leberversagen unabhängig vom TNFR1 auf diesen Zellen abläuft. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der LPS-induzierte septische Schock nicht von dem TNFR1 auf diesen Zellen vermittelt wird, da die Deletion des TNFR1 auf MDCs keinen Überlebensvorteil erbrachte. Um den Wirkungsort des TNF identifizieren zu können, müsste der LPS-induzierte Schock näher untersucht werden. Eine weitere Erklärung dafür, dass sich in den Mauslinien mit jeweils spezifischer TNFR1 Deletion in einem Zell- bzw. Gewebetyp kein Unterschied zu den Kontrolltieren zeigte, wäre eine kombinierte Wirkung von TNF auf TNFR1 in verschiedenen Geweben zugleich.

Die Aufklärung der Wirkungsweise der TNF/TNFR1 Signalachse ist für viele Erkrankungen des Menschen von Bedeutung. Anti-TNF-Präparate werden trotz zahlreicher Nebenwirkungen und des Risikos Infektionen nicht abwehren zu können bei vielen Erkrankungen verschrieben, unter anderem auch bei Colitis ulcerosa, Morbus Crohn¹²⁸ oder bei autoimmuner Hepatitis (AIH)⁶⁷. Die Wirkungsweise der Anti-TNF-Präparate bei AIH ist jedoch noch unklar. Es wurde vorgeschlagen, dass die anti-TNF-Präparate bei der Eliminierung (auto-reaktiver) T-Zellen helfen^{67,129,130}. Im Rahmen

dieses Projekts konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass die anti-TNF-Präparate auch eine andere Wirkungsweise haben könnten. Bei der AIH könnte TNF an den TNFR1 auf MDCs binden, die in der Folge T-Zellen aktivieren, die schließlich zur Schädigung der Leber führen. Durch die Behandlung mit anti-TNF-Präparaten würde TNF daran gehindert an den TNFR1 der MDCs zu binden, was die Aktivierung der T-Lymphozyten und damit den Leberschaden unterdrückt.

Zusammenfassend konnte der TNFR1 auf MDCs als der Wirkungsort von TNF im Concanavalin A Modell der experimentellen Hepatitis identifiziert werden. Im Kontext mit publizierten Daten zum ConA Modell können die Ergebnisse folgendermaßen interpretiert werden: In Folge der ConA-Injektion wird TNF abhängig von JNK1 und 2 in MDCs⁶⁰, von rekrutierten inflammatorischen Makrophagen und T-Lymphozyten produziert^{79,114}, das anschließend an den TNFR1 auf (TNF produzierenden oder anderen) Makrophagen, Monozyten und/oder neutrophilen Granulozyten bindet. Die Bindung von TNF an TNFR1 auf MDCs hat ein Priming^{114,131} oder eine Aktivierung dieser Zellen zur Folge, die schließlich ein Effektorsystem für die Induktion des Zelltods im Leberparenchym in Kraft setzt. Da im Rahmen dieses Projekts gezeigt werden konnte, dass der Tod der Leberparenchymzellen nicht direkt durch die Todesrezeptoren vermittelt wird, bleibt unklar, wie der Leberschaden in diesem Modell entsteht. MDCs könnten im aktivierten Zustand selber für einen Zellschaden des Leberparenchyms verantwortlich sein^{132,133}. Alternativ könnte TNF über TNFR1 an MDCs auch eine entscheidende Bedeutung haben für den Beginn einer Mikrozirkulationsstörung, die zu Thrombenbildung und Parenchymnekrosen führt¹¹⁹. Für die ConA-induzierten Hepatitis ist die essentielle Rolle der T-Lymphozyten bekannt^{72,73}. Daher wäre es auch möglich, dass T-Zellen direkt am Tod der Hepatozyten beteiligt sind. T-Zellen könnten in Folge ihrer Aktivierung Perforin und Granzym B sezernieren. Die Membran der Hepatozyten würde durch Perforin permeabilisiert werden was schließlich zum Tod der Zellen führen könnte^{117,134}. In TNFR1^{MDC-KO} Tieren würden die T-Lymphozyten nicht aktiviert werden, was letztendlich vor der Entstehung des Leberschadens schützen würde.

4.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Wirkungsort des TNF in der ConA-induzierten Hepatitis nicht, wie vermutet, der TNFR1 auf Leberparenchymzellen ist. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass die Leberschädigung in diesem Modell von dem TNFR1 auf MDCs abhängig ist. Um diesen Mechanismus näher zu charakterisieren sollten weitere Untersuchungen erfolgen, die auf die Effektor-Funktionen der MDCs abzielen. Es soll untersucht werden, ob durch die zellspezifische Deletion in den TNFR1^{MDC-KO} Tieren die Fähigkeit der neutrophilen Granulozyten zur Produktion von

reaktiven Sauerstoffspezies eingeschränkt wird. Da neutrophile Granulozyten bei der Chemotaxis der CD4⁺ T-Zellen eine Rolle spielen, soll außerdem untersucht werden, ob die zellspezifische Deletion des TNFR1 einen Einfluss auf die Einwanderung der CD4⁺ T-Zellen hat. Hierfür soll die Anzahl an CD4⁺ T-Zellen in Lebern ConA behandelter TNFR1^{MDC-KO} und TNFR1^{FL} Tiere quantifiziert und verglichen werden. Zusätzlich sollte die absolute Anzahl an verschiedenen Populationen wie Ly6C⁺ und Ly6C⁻ Makrophagen, sowie Monozyten und T-Zellen in Lebern behandelter und unbehandelter Tiere bestimmt werden. Im Rahmen des aktuellen Projekts wurde lediglich der relative prozentuelle Anteil dieser Zellen an der gesamten Lymphozyten-Population bestimmt. Durch die Bestimmung der absoluten Anzahl genormt beispielweise auf das Lebergewicht könnte eine mögliche Bedeutung dieser Zellpopulationen evaluiert werden.

Es sollte außerdem untersucht werden, ob die Makrophagen und Monozyten trotz der TNFR1 Deletion aktiviert werden können oder ob sie ihrerseits andere Zellen aktivieren können.

Um einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Schutz der TNFR1^{MDC-KO} Tiere und der etwas höheren Konzentration an IL-10 im Serum dieser Tiere im ConA Modell zu untersuchen, sollten Tiere generiert und anschließend im Kontext der ConA-induzierten Hepatitis untersucht werden, die zusätzlich zur zellspezifischen Deletion des TNFR1 ebenfalls einen IL-10 Knock-Out aufweisen.

Außerdem könnte der TNF Wirkungsort weiter spezifiziert werden. Um herauszufinden, ob der TNFR1 auf bestimmten Makrophagen, Monozyten oder neutrophilen Granulozyten oder auf anderen Zellpopulationen, die teilweise von der Deletion betroffen sind, wie zum Beispiel Mastzellen, für den Leberschaden essentiell ist, würde hierzu jeweils eine dieser Zellpopulationen durch adaptiven Transfer von wildtypischen Zellen ersetzt werden. Nach anschließender ConA-Behandlung kann herausgefunden werden, ob die Tiere eine Leberentzündung entwickeln.

Zusätzlich sollte diese Funktion des TNFR1 auf MDCs in anderen Modellen immunmediierter Erkrankungen wie zum Beispiel das Modell der bakteriellen Infektion verursacht durch *Listeria monocytogenes*. Es wurde gezeigt, dass TNFR1^{-/-} Tiere in Folge einer Infektion mit Listerien sterben⁸⁴, der genaue Wirkungsort von TNF ist jedoch nicht bekannt.

Die Bedeutung von TNFR1 auf MDCs ist im Kontext der chronischer Hepatopathie ebenfalls vollkommen unbekannt und sollte untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Die Hauptaufgabe des Immunsystems ist der Schutz des Organismus vor Infektionen. Angeborene und adaptive Immunantwort kooperieren hierbei in der Beseitigung von Infektionserregern. Die Entstehung von Autoimmunität oder die Schädigung des Organismus durch eine übermäßige Immunreaktion verdeutlicht die Notwendigkeit einer reibungslosen Immunregulation. Im Rahmen der Erforschung der Ätiopathogenese vieler Lebererkrankungen, wie beispielsweise Virus-Hepatitis, autoimmune Hepatitis (AIH) oder die primäre sklerosierende Cholangitis (PSC), konnte eine wesentliche Bedeutung des Immunsystems für diese Krankheiten herausgearbeitet werden.

Die Apoptose ist ein entscheidender Prozess in der Entwicklung und Homöostase eines Organismus. Durch diesen programmierten Zelltod werden unerwünschte Zellen während der Embryonalentwicklung aber auch unter anderem nach erfolgter Immunabwehr eliminiert. Der extrinsische Apoptose-Weg wird durch die Bindung von Todesliganden an Todesrezeptoren wie TNFR1 initiiert. Der prototypische Todesligand TNF (Tumor-Nekrose-Faktor) ist ein proinflammatorisches Zytokin, das über den Rezeptor TNFR1 sowohl pro- als auch antiapoptotische Signale vermitteln kann. Durch TNF initiierte Signalwege sind in vielen Erkrankungen von kritischer Bedeutung. Eine Reihe von autoinflammatorischen Erkrankungen werden mit anti-TNF-Präparaten therapiert. Die genaue Wirkungsweise von TNF bleibt jedoch ebenso unverstanden wie das Auftreten von Therapieversagen. Eine systemische Inhibierung von TNF ist zudem mit dem Risiko von Infektionen verbunden. Für die Entwicklung einer gezielteren Therapie ist die Detailkenntnis des TNF-Signalwegs daher unabdingbar.

Zur Untersuchung der Todesrezeptoren in immunvermittelten Lebererkrankungen wurden im Rahmen dieser Arbeit das Concanavalin A Modell der experimentellen Hepatitis, das Aspekte der AIH aufweist, das LPS/Gal Modell des akuten Leberversagens sowie das LPS Modell des septischen Schocks verwendet. Für diese Erkrankungen wurde sowohl TNF als auch TNFR1 eine essentielle Funktion zugeschrieben. Um den genauen Wirkungsort der TNF/TNFR1 Signalkaskade zu analysieren wurden Mauslinien generiert, die spezifische Deletionen des TNFR1 auf den Zellen des Leberparenchyms, den T-Zellen, den Endothelzellen oder den MDCs (myeloid derived cells, hauptsächlich Makrophagen, Monozyten und neutrophile Granulozyten) aufwiesen. Mit Hilfe dieser konditionellen Knock-Out Mauslinien konnte eine differenzierte Rolle des TNFR1 in unterschiedlichen Modellen der Hepatitis beschrieben werden. Es konnte gezeigt werden, dass der ConA-induzierte Leberschaden nicht wie oft angenommen von Leberparenchym-intrinsischem TNFR1 sondern von TNFR1 auf MDCs mediiert wird. Im Gegensatz hierzu konnte gezeigt werden, dass der Wirkungsort des TNF im LPS/Gal Modell des akuten Leberversagens der TNFR1 auf den Zellen des Leberparenchyms ist. Für das LPS Modell konnte gezeigt werden, dass der zellspezifische TNFR1

Knock-Out weder auf Leberparenchymzellen noch auf T-Lymphozyten, Endothelzellen oder MDCs einen Überlebensvorteil mit sich bringt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der T-Zell- und der Endothelzell-residente TNFR1 sowohl im ConA Modell als auch im LPS/Gal Modell entbehrlich sind und, dass der ConA-induzierte Leberschaden nicht von den Todesrezeptoren Fas und TRAILR auf dem Leberparenchym mediiert wird.

Während im LPS/Gal Modell der TNF an den TNFR1 der durch Gal sensitivierten Leberparenchymzellen bindet und bedingt durch die Inhibierung des NF- κ B Signalwegs zum Zelltod führt, bleibt die genaue Funktionsweise des Leberschadens im ConA Modell weiterhin unklar.

TNFR1^{MDC-KO} Tiere zeigten keinen Unterschied in der Produktion von Chemokinen, Zytokinen oder in der Rekrutierung der MDCs in die Leber, was darauf hindeutet, dass der Schutz dieser Tiere vor Leberschädigung durch einen anderen Mechanismus vermittelt wird.

6 Abstract

The major task of the immune system is the protection of the organism against pathogens. The innate and the adaptive immunity cooperate in eliminating infectious microbes. The necessity of a functional immune regulation is illustrated by the consequences of autoimmunity or the damage induced by an excessive immune reaction. The immune system has been shown to play a fundamental role in many liver diseases such as virus hepatitis, autoimmune hepatitis (AIH) or primary sclerosing cholangitis (PSC).

Apoptosis is essential for the development and the homeostasis of the organism. This programmed cell death eliminates unsolicited cells during embryonic development and in the course of an immune defense. The extrinsic apoptotic pathway is initiated by the binding of death ligands to death receptors. Tumor necrosis factor, TNF as the prototypical death receptor ligand is a proinflammatory cytokine that can induce death but also signals cell survival and immune activation through its receptor TNFR1. TNF initiated pathways are essential for many pathologies and drugs blocking TNF have become a central option in the treatment of auto inflammatory diseases. However, the mechanistic details of TNF function and the occurrence of therapy failure remain incompletely understood. Of note, interfering with TNF to treat auto inflammatory diseases increases the risk of infectious side effects. For the development of targeted therapies the TNF/TNFR1 signal pathway has to be further elucidated.

The aim of this study was to examine the cell specific function of death receptors in immune mediated liver diseases using the concanavalin A model of experimental hepatitis which imitates important aspects of AIH, the LPS/Gal model of acute liver failure and the LPS model of septic shock. For these models the TNF pathway has been shown to fulfill an essential function. To examine the cell specific function of the TNF/TNFR1 pathway we used mouse strains with tissue specific deletion of TNFR1 in liver parenchymal cells, T-cells, endothelial cells and myeloid derived cells (MDCs, mainly macrophages, monocytes and neutrophil granulocytes). The results unveil a cell specific function of TNFR1 in distinct models of hepatitis. For ConA-induced hepatitis, we could show that liver damage is mediated by MDC-intrinsic TNFR1. Diversely, in the LPS/Gal model of acute liver injury we found mice with a liver parenchymal cell specific ablation of TNFR1 protected against liver failure. For the LPS model we failed to detect differences in overall survival when comparing LPC and MDC conditional knock-out mice with controls. We could further show that T-cell and endothelial cell specific TNFR1 is dispensable in these models of experimental hepatitis. Moreover, using mice with additional ablation of death receptors we can exclude a role of Fas and TRAILR in LPCs in ConA-induced hepatitis. Analyses of the release of chemokines, cytokines or in the recruitment of inflammatory cells to the liver failed to explain the protection against T cell mediated hepatitis in mice with deletion of TNFR1

in MDCs. Hence, to unravel the deleterious function of MDC TNFR1 in T cell induced hepatitis further studies will be needed.

7 Literaturverzeichnis

1. Abbas, A. K. & Lichtman, A. H. *Basic Immunology; Functions and Disorders of the Immune System*. (Saunders Elsevier Verlag, 2009).
2. Schütt, C. & Bröcker, B. *Grundwissen Immunologie*. (Spektrum Akademischer Verlag, 2009).
3. Dale, D. C., Boxer, L., Liles, W. C. & De, W. The phagocytes : neutrophils and monocytes. *Hematology* **112**, 935–945 (2012).
4. Fujita, T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 346–353 (2002).
5. Soehnlein, O. & Lindbom, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 427–439 (2010).
6. Murphy, K. M. *Janeway's Immunobiology*. (2012).
7. Medzhitov, R. & Janeway, C. a. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* **296**, 298–300 (2002).
8. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**, 428–35 (2008).
9. Turner, M. W. Mannose-binding lectin: The pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol. Today* **17**, 532–540 (1996).
10. Thomson, A. W. & Knolle, P. a. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 753–66 (2010).
11. Chen, L. & Flies, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 227–42 (2013).
12. Heit, A., Huster, K. M., Schmitz, F., Schiemann, M., Busch, D. H. & Wagner, H. CpG-DNA aided cross-priming by cross-presenting B cells. *J. Immunol.* **172**, 1501–1507 (2004).
13. Kurts, C., Robinson, B. W. S. & Knolle, P. a. Cross-priming in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 403–14 (2010).
14. Doherty, D. G. & O'Farrelly, C. Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunol. Rev.* **174**, 5–20 (2000).
15. Yewdell, J. W. & Haeryfar, S. M. M. Understanding presentation of viral antigens to CD8+ T cells in vivo: the key to rational vaccine design. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 651–682 (2005).
16. Janeway, C. J. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* **13**, 11–16 (1992).

17. Kurts, C., Kosaka, H., Carbone, F. R., Miller, J. F. & Heath, W. R. Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J. Exp. Med.* **186**, 239–245 (1997).
18. Zehn, D. & Bevan, M. J. T Cells with Low Avidity for a Tissue-Restricted Antigen Routinely Evade Central and Peripheral Tolerance and Cause Autoimmunity. *Immunity* **25**, 261–270 (2006).
19. Marrack, P., Kappler, J. & Kotzin, B. L. Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nat. Med.* **7**, 899–905 (2001).
20. Naparstek, Y. & Plotz, P. H. The role of autoantibodies in autoimmune disease. *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 79–104 (1993).
21. Nagata, S., Hanayama, R. & Kawane, K. Autoimmunity and the Clearance of Dead Cells. *Cell* **140**, 619–630 (2010).
22. Wehner, R. & Gehring, W. J. *Zoologie*. (Georg Thieme Verlag, 2013).
23. Protzer, U., Maini, M. K. & Knolle, P. a. Living in the liver: hepatic infections. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 201–13 (2012).
24. Knolle, P. A. & Gerken, G. Local control of the immune response in the liver. *Immunol. Rev.* **174**, 21–34 (2000).
25. Crispe, I. N. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 51–62 (2003).
26. Inatsu, A., Kinoshita, M., Nakashima, H., Shimizu, J., Saitoh, D., Tamai, S. & Seki, S. Novel mechanism of C-reactive protein for enhancing mouse liver innate immunity. *Hepatology* **49**, 2044–2054 (2009).
27. Aron, J. H. & Bowlus, C. L. The immunobiology of primary sclerosing cholangitis. *Semin. Immunopathol.* **31**, 383–397 (2009).
28. Lohse, A. W. & Mieli-Vergani, G. Autoimmune hepatitis. *J. Hepatol.* **55**, 171–182 (2011).
29. *Autoimmune liver diseases*. (Springer Science, 2014).
30. Monga, S. [Editor]. *Molecular Pathology of Liver Diseases*. Springer Verlag (Springer Science, 2011).
31. Guicciardi, M. E. Apoptosis and Necrosis in the Liver. *Compr. Physiol.* **3**, (2013).
32. Löffler, G. *Basiswissen Biochemie*. (Springer-Lehrbuch, 2005).
33. Steller, H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* **267**, 1445–1449 (1995).
34. Thompson, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456–1462 (1995).
35. Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell* **88**, 355–365 (1997).

36. Yoon, J. H. & Gores, G. J. Death receptor-mediated apoptosis and the liver. *J. Hepatol.* **37**, 400–410 (2002).
37. Thon, L., Mathieu, S., Kabelitz, D. & Adam, D. The murine TRAIL receptor signals caspase-independent cell death through ceramide. *Exp. Cell Res.* **312**, 3808–3821 (2006).
38. Wu, G. S., Burns, T. F., Zhan, Y., Alnemri, E. S. & El-Deiry, W. S. Molecular cloning and functional analysis of the mouse homologue of the KILLER/DR5 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor. *Cancer Res.* **59**, 2770–2775 (1999).
39. *Tumor necrosis factor*. (Nova Biomedical Books, 2009).
40. Chen, G. & Goeddel, D. V. TNF-R1 Signaling : A Beautiful Pathway The Fas Signaling Pathway : More Than a Paradigm. *Science (80-.)*. **296**, (2002).
41. Locksley, R. M., Killeen, N. & Lenardo, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell* **104**, 487–501 (2001).
42. Tartaglia, L. A., Pennica, D. & Goeddel, D. V. Ligand passing: The 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J. Biol. Chem.* **268**, 18542–18548 (1993).
43. Ashkenazi, A. & Dixit, V. M. Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305–1308 (1998).
44. Beyaert, R., Vanhaesebroeck, B., Declercq, W., Vanlint, J., Vandenaabeele, P., Agostinis, P., Vandenneede, J. R. & Fiers, W. Casein Kinase-1 Phosphorylates the P75 Tumor-Necrosis-Factor Receptor and Negatively Regulates Tumor-Necrosis-Factor Signaling for Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **270**, 23293–23299 (1995).
45. Schwabe, R. F. & Brenner, D. a. Mechanisms of Liver Injury . I . TNF- \alpha -induced liver injury : role of IKK , JNK , and ROS pathways. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 583–589 (2006). doi:10.1152/ajpgi.00422.2005.
46. Liu, Z. G., Hsu, H., Goeddel, D. V. & Karin, M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-??B activation prevents cell death. *Cell* **87**, 565–576 (1996).
47. Pasparakis, M. Regulation of tissue homeostasis by NF-kappaB signalling: implications for inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 778–88 (2009).
48. Micheau, O., Boveresses, C. & Epalinges, C.-. Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes. *Cell* **114**, 181–190 (2003).
49. Chen, C. C. & Lau, L. F. Deadly liaisons: Fatal attraction between CCN matricellular proteins and the tumor necrosis factor family of cytokines. *J. Cell Commun. Signal.* **4**, 63–69 (2010).
50. Wajant, H., Pfizenmaier, K. & Scheurich, P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* **10**, 45–65 (2003).
51. Hayden, M. S. & Ghosh, S. NF-kB, the first quarter-century: Remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev.* **26**, 203–234 (2012).

52. Ehlken, H., Krishna-Subramanian, S., Ochoa-Callejero, L., Kondylis, V., Nadi, N. E., Straub, B. K., Schirmacher, P., Walczak, H., Kollias, G. & Pasparakis, M. Death receptor-independent FADD signalling triggers hepatitis and hepatocellular carcinoma in mice with liver parenchymal cell-specific NEMO knockout. *Cell Death Differ.* 1–12 (2014). doi:10.1038/cdd.2014.83
53. Wullaert, A., Heyninck, K. & Beyaert, R. Mechanisms of crosstalk between TNF-induced NF- κ B and JNK activation in hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 1090–1101 (2006).
54. Luedde, T., Beraza, N., Kotsikoris, V., van Loo, G., Nenci, A., De Vos, R., Roskams, T., Trautwein, C. & Pasparakis, M. Deletion of NEMO/IKK γ in Liver Parenchymal Cells Causes Steatohepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Cell* **11**, 119–132 (2007).
55. Ding, W.-X. & Yin, X.-M. Dissection of the multiple mechanisms of TNF- α -induced apoptosis in liver injury. *J. Cell. Mol. Med.* **8**, 445–454 (2004).
56. Sluss, H. K., Barrett, T., Derijard, B. & Davis, R. J. Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 8376 (1994).
57. Adhikari, a, Xu, M. & Chen, Z. J. Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene* **26**, 3214–3226 (2007).
58. Reuther-Madrid, J. & Kashatus, D. The p65 / RelA Subunit of NF- κ B Suppresses the Sustained , Antiapoptotic Activity of Jun Kinase Induced by Tumor Necrosis Factor. ... *Cell. Biol.* **22**, 8175–8183 (2002).
59. Kamata, H., Honda, S. I., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H. & Karin, M. Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* **120**, 649–661 (2005).
60. Das, M., Sabio, G., Jiang, F., Rincón, M., Flavell, R. a & Davis, R. J. Induction of hepatitis by JNK-mediated expression of TNF- α . *Cell* **136**, 249–60 (2009).
61. Lamb, J. A., Ventura, J. J., Hess, P., Flavell, R. A. & Davis, R. J. JunD mediates survival signaling by the JNK signal transduction pathway. *Mol. Cell* **11**, 1479–1489 (2003).
62. Ventura, J.-J., Hübner, A., Zhang, C., Flavell, R. A., Shokat, K. M. & Davis, R. J. Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. *Mol. Cell* **21**, 701–710 (2006).
63. Akazawa, Y. & Gores, G. J. Death Receptor – Mediated Liver Injury. *Liver* **1**, 327–338 (2007).
64. Criscione, L. & St. Clair, E. Tumor necrosis factor- α antagonists for the treatment of rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol.* **14**, 204–211 (2002).
65. Tracey, D., Klareskog, L., Sasso, E. H., Salfeld, J. G. & Tak, P. P. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Pharmacol. Ther.* **117**, 244–279 (2008).
66. Karampetsou, M. P., Liossis, S. N. C. & Sfikakis, P. P. TNF- α antagonists beyond approved indications: Stories of success and prospects for the future. *Qjm* **103**, 917–928 (2010).

67. Weiler-Normann, C., Schramm, C., Quaas, A., Wiegand, C., Glaubke, C., Pannicke, N., Möller, S. & Lohse, A. W. Infliximab as a rescue treatment in difficult-to-treat autoimmune hepatitis. *J. Hepatol.* **58**, 529–534 (2013).
68. Keane, J., Gershon, S., Wise, R. P., Mirabile-Levens, E., Kasznica, J., Schwieterman, W. D., Siegel, J. N. & Braun, M. M. Tuberculosis associated with infliximab. *N. Engl. J. Med.* **345**, 1098–1104 (2001).
69. Keystone, E. C., Kavanaugh, A. F., Sharp, J. T., Tannenbaum, H., Hua, Y., Teoh, L. S., Fischkoff, S. a. & Chartash, E. K. Radiographic, Clinical, and Functional Outcomes of Treatment with Adalimumab (a Human Anti-Tumor Necrosis Factor Monoclonal Antibody) in Patients with Active Rheumatoid Arthritis Receiving Concomitant Methotrexate Therapy: A Randomized, Placebo-Controlled. *Arthritis Rheum.* **50**, 1400–1411 (2004).
70. Naveau, S., Chollet-Martin, S., Dharancy, S., Mathurin, P., Jouet, P., Piquet, M. A., Davion, T., Oberti, F., Broët, P. & Emilie, D. A Double-Blind Randomized Controlled Trial of Infliximab Associated with Prednisolone in Acute Alcoholic Hepatitis. *Hepatology* **39**, 1390–1397 (2004).
71. Boetticher, N. C., Peine, C. J., Kwo, P., Abrams, G. a., Patel, T., Aqel, B., Boardman, L., Gores, G. J., Harmsen, W. S., McClain, C. J., Kamath, P. S. & Shah, V. H. A Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Multicenter Trial of Etanercept in the Treatment of Alcoholic Hepatitis. *Gastroenterology* **135**, 1953–1960 (2008).
72. Tiegs, G., Hentschel, J. & Wendel, a. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J. Clin. Invest.* **90**, 196–203 (1992).
73. Takeda, K., Hayakawa, Y., Van Kaer, L., Matsuda, H., Yagita, H. & Okumura, K. Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 5498–5503 (2000).
74. Falk, L. a., McNally, R., Perera, P. Y., Kenny, J. & Vogel, S. N. LPS-inducible responses in severe combined immunodeficiency (SCID) mice. *Innate Immun.* **2**, 273–280 (1995).
75. Freudenberg, M. a, Keppler, D. & Galanos, C. Requirement for lipopolysaccharide-responsive macrophages in galactosamine-induced sensitization to endotoxin. *Infect. Immun.* **51**, 891–5 (1986).
76. Palacios, R. Concanavalin A triggers T lymphocytes by directly interacting with their receptors for activation. *J. Immunol.* **128**, 337–342 (1982).
77. Küsters, S., Tiegs, G., Alexopoulou, L., Pasparakis, M., Douni, E., Künstle, G., Bluethmann, H., Wendel, a, Pfizenmaier, K., Kollias, G. & Grell, M. In vivo evidence for a functional role of both tumor necrosis factor (TNF) receptors and transmembrane TNF in experimental hepatitis. *Eur. J. Immunol.* **27**, 2870–5 (1997).
78. Maeda, S., Chang, L., Li, Z. W., Luo, J. L., Leffert, H. & Karin, M. IKK β is required for prevention of apoptosis mediated by cell-bound but not by circulating TNF α . *Immunity* **19**, 725–737 (2003).
79. Grivennikov, S. I., Tumanov, A. V., Liepinsh, D. J., Kruglov, A. a, Marakusha, B. I., Shakhov, A. N., Murakami, T., Drutskaya, L. N., Förster, I., Clausen, B. E., Tessarollo, L., Ryffel, B., Kuprash, D. V & Nedospasov, S. a. Distinct and nonredundant in vivo functions of TNF produced by t cells

- and macrophages/neutrophils: protective and deleterious effects. *Immunity* **22**, 93–104 (2005).
80. Heymann, F., Hamesch, K., Weiskirchen, R. & Tacke, F. The concanavalin A model of acute hepatitis in mice. *Lab. Anim.* **49**, 12–20 (2015).
81. Küsters, S., Gantner, F., Kunstle, G. & Tiegs, G. Interferon gamma plays a critical role in T cell-dependent liver injury in mice initiated by concanavalin A. *Gastroenterology* **111**, 462–471 (1996).
82. Galanos, C., Freudenberg, M. a & Reutter, W. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 5939–5943 (1979).
83. Lehmann, V., Freudenberg, M. A. & Galanos, C. LETHAL TOXICITY OF LIPOPOLYSACCHARIDE AND TUMOR NECROSIS FACTOR IN NORMAL AND D-GALACTOSAMINE-TREATED MICE
Endotoxins (lipopolysaccharides , LPS) are the main factors of pathogenicity of Gram-negative bacteria . In experimental animals , they induce a b. *J. Exp. Med.* **165**, 657–663 (1987).
84. Pfeffer, K., Matsuyama, T., Kündig, T. M., Wakeham, A., Kishihara, K., Shahinian, A., Wiegmann, K., Ohashi, P. S., Krönke, M. & Mak, T. W. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection. *Cell* **73**, 457–67 (1993).
85. Tiegs, G., Wolter, M. & Wendel, A. Tumor necrosis factor is a terminal mediator in galactosamine/endotoxin-induced hepatitis in mice. *Biochem. Pharmacol.* **38**, 627–31 (1989).
86. Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. & Beutler, B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085–2088 (1998).
87. Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K. & Akira, S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.* **162**, 3749–3752 (1999).
88. Schuler, W., Weiler, I. J., Schuler, a, Phillips, R. a, Rosenberg, N., Mak, T. W., Kearney, J. F., Perry, R. P. & Bosma, M. J. Rearrangement of antigen receptor genes is defective in mice with severe combined immune deficiency. *Cell* **46**, 963–972 (1986).
89. Spooner, C. E., Markowitz, N. P. & Saravolatz, L. D. The role of tumor necrosis factor in sepsis. *Clin Immunol Immunopathol.* **62**, 11–17 (1992).
90. Descamps, D., Vigant, F., Esselin, S., Connault, E., Opolon, P., Perricaudet, M. & Benihoud, K. Expression of non-signaling membrane-anchored death receptors protects murine livers in different models of hepatitis. *Hepatology* **44**, 399–409 (2006).
91. Beutler, B., Milsark, I. W. & Cerami, A. C. Passive Immunization Against Cachectin/Tumor Necrosis Factor Protects Mice from Lethal Effect of Endotoxin. *Science (80-.)*. 869–871 (1985).

92. Sass, G., Heinlein, S., Agli, A., Bang, R., Schümann, J. & Tiegs, G. Cytokine expression in three mouse models of experimental hepatitis. *Cytokine* **19**, 115–120 (2002).
93. Tracey, K. J., Beutler, B., Lowry, S. F., Merryweather, J., Wolpe, S., Milsark, I. W., Hariri, R. J., Fahey, T. J., Zentella, a & Albert, J. D. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* **234**, 470–474 (1986).
94. Sternberg, N. & Hamilton, D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. *J. Mol. Biol.* **150**, 467–486 (1981).
95. Hoess, R. H., Ziese, M. & Sternberg, N. P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 3398–3402 (1982).
96. Argos, P., Landy, a, Abremski, K., Egan, J. B., Haggard-Ljungquist, E., Hoess, R. H., Kahn, M. L., Kalionis, B., Narayana, S. V & Pierson, L. S. The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. *EMBO J.* **5**, 433–440 (1986).
97. Rajewsky, K., Gu, H., Kühn, R., Betz, U. A. K., Müller, W., Roes, J. & Schwenk, F. Conditional gene targeting. *J Clin Invest* **98**, 600–603 (1996).
98. Gu, H., Marth, J. D., Orban, P. C., Mossmann, H. & Rajewsky, K. Deletion of a DNA Polymerase β Gene Segment in T Cells Using Cell Type-Specific Gene Targeting. *Science (80-)*. **265**, (1994).
99. Hayashi, S. & McMahon, A. P. Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Dev. Biol.* **244**, 305–318 (2002).
100. Van Hauwermeiren, F., Armaka, M., Karagianni, N., Kranidioti, K., Vandenbroucke, R. E., Loges, S., Van Roy, M., Staelens, J., Puimège, L., Palagani, A., Vanden Berghe, W., Victoratos, P., Carmeliet, P., Libert, C. & Kollias, G. Safe TNF-based antitumor therapy following p55TNFR reduction in intestinal epithelium. *J. Clin. Invest.* **123**, 2590–2603 (2013).
101. Kellendonk, C., Opherk, C., Anlag, K., Schütz, G. & Tronche, F. Hepatocyte-specific expression of Cre recombinase. *Genesis* **26**, 151–153 (2000).
102. Lee, P. P., Fitzpatrick, D. R., Beard, C., Jessup, H. K., Lehar, S., Makar, K. W., Pérez-Melgosa, M., Sweetser, M. T., Schlissel, M. S., Nguyen, S., Cherry, S. R., Tsai, J. H., Tucker, S. M., Weaver, W. M., Kelso, a, Jaenisch, R. & Wilson, C. B. A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity* **15**, 763–774 (2001).
103. Alva, J. A., Zovein, A. C., Monvoisin, A., Murphy, T., Salazar, A., Harvey, N. L., Carmeliet, P. & Iruela-Arispe, M. L. VE-cadherin-cre-recombinase transgenic mouse: A tool for lineage analysis and gene deletion in endothelial cells. *Dev. Dyn.* **235**, 759–767 (2006).
104. Clausen, B. E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R. & Förster, I. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res.* **8**, 265–277 (1999).
105. Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M. & Myrtek, D. *Der Experimentator Immunologie*. (Spektrum Akademischer Verlag, 2009).

106. Bonder, C. S., Ajuebor, M. N., Zbytniuk, L. D., Kubes, P. & Swain, M. G. Essential role for neutrophil recruitment to the liver in concanavalin A-induced hepatitis. *J. Immunol.* **172**, 45–53 (2004).
107. Tagawa, Y., Sekikawa, K. & Iwakura, Y. Suppression of concanavalin A-induced hepatitis in IFN-gamma(-/-) mice, but not in TNF-alpha(-/-) mice: role for IFN-gamma in activating apoptosis of hepatocytes. *J. Immunol.* **159**, 1418–1428 (1997).
108. Kusters, S., Gantner, F., Kunstle, G. & Tiegs, G. Interferon gamma plays a critical role in T cell-dependent liver injury in mice initiated by concanavalin A. *Gastroenterology* **111**, 462–471 (1996).
109. Netea, M. G., Simon, A., van de Veerdonk, F., Kullberg, B.-J., Van der Meer, J. W. M. & Joosten, L. a B. IL-1beta processing in host defense: beyond the inflammasomes. *PLoS Pathog.* **6**, e1000661 (2010).
110. Malchow, S., Thaiss, W., Jänner, N., Waetzig, G. H., Gewiese-Rabsch, J., Garbers, C., Yamamoto, K., Rose-John, S. & Scheller, J. Essential role of neutrophil mobilization in concanavalin A-induced hepatitis is based on classic IL-6 signaling but not on IL-6 trans-signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **1812**, 290–301 (2011).
111. Toyabe, S., Takeda, K., Shirai, K., Watanabe, H., Hiraide, H., Uchiyama, M. & Abo, T. Requirement of IL-4 and Liver NK1+ T Cells for Concanavalin A-Induced Hepatic Injury in Mice. *J. Immunol.* **159**, 1537–1542 (1997).
112. Di Marco, R., Xiang, M., Zaccone, P., Leonardi, C., Franco, S., Meroni, P. & Nicoletti, F. Concanavalin A-induced hepatitis in mice is prevented by interleukin (IL)-10 and exacerbated by endogenous IL-10 deficiency. *Autoimmunity* **2**, 75–83 (1999).
113. Louis, H., Le Moine, O., Peny, M. O., Quertinmont, E., Fokan, D., Goldman, M. & Devière, J. Production and role of interleukin-10 in concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* **25**, 1382–1389 (1997).
114. Schiwon, M., Weisheit, C., Franken, L., Gutweiler, S., Dixit, A., Meyer-Schwesinger, C., Pohl, J.-M., Maurice, N. J., Thiebes, S., Lorenz, K., Quast, T., Fuhrmann, M., Baumgarten, G., Lohse, M. J., Opdenakker, G., Bernhagen, J., Bucala, R., Panzer, U., Kolanus, W., Gröne, H.-J., Garbi, N., Kastenmüller, W., Knolle, P. a, Kurts, C. & Engel, D. R. Crosstalk between Sentinel and Helper Macrophages Permits Neutrophil Migration into Infected Uroepithelium. *Cell* **156**, 456–68 (2014).
115. Zheng, S., Wang, P., Tsabary, G. & Chen, Y. H. Critical roles of TRAIL in hepatic cell death and hepatic inflammation. *J. Clin. Invest.* **113**, 58–64 (2004).
116. Seino, K., Kayagaki, N., Takeda, K., Fukao, K., Okumura, K. & Yagita, H. Contribution of Fas ligand to T cell-mediated hepatic injury in mice. *Gastroenterology* **113**, 1315–1322 (1997).
117. Watanabe, Y., Morita, M., Akaike, T., Kakimi, K., Lane, T. E., Wieland, S., Asensio, V. C., Campbell, I. L., Chisari, F. V & Guidotti, L. G. Concanavalin A induces perforin-mediated but not Fas-mediated hepatic injury. *Hepatology* **24**, 702–710 (1996).

118. Kägi, D., Vignaux, F., Ledermann, B., Bürki, K., Depraetere, V., Nagata, S., Hengartner, H. & Golstein, P. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* **265**, 528–530 (1994).
119. Kato, J., Okamoto, T., Motoyama, H., Uchiyama, R., Kirchhofer, D., Van Rooijen, N., Enomoto, H., Nishiguchi, S., Kawada, N., Fujimoto, J. & Tsutsui, H. Interferon γ -mediated tissue factor expression contributes to T cell-mediated hepatitis via induction of hypercoagulation in mice. *Hepatology* 362–372 (2013). doi:10.1002/hep.26027
120. Gantner, F., Leist, M., Lohse, A. W., Germann, P. G. & Tiegs, G. Concanavalin A-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice: the role of tumor necrosis factor. *Hepatology* **21**, 190–8 (1995).
121. Biburger, M. & Tiegs, G. in *Liver Immunology: Principles and Practice* 293–306 doi:10.1016/j.intimp.2011.05.020
122. Geissmann, F., Jung, S. & Littman, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**, 71–82 (2003).
123. Van den Steen, P. E., Dubois, B., Nelissen, I., Rudd, P. M., Dwek, R. a & Opdenakker, G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **37**, 375–536 (2002).
124. Schumacher, C., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M. & Moser, B. High- and low-affinity binding of GRO α and neutrophil-activating peptide 2 to interleukin 8 receptors on human neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 10542–10546 (1992).
125. Moser, B., Clark-Lewis, I., Zwahlen, R. & Baggiolini, M. Neutrophil-activating properties of the melanoma growth-stimulatory activity. *J. Exp. Med.* **171**, 1797–1802 (1990).
126. Farber, J. M. A macrophage mRNA selectively induced by gamma-interferon encodes a member of the platelet factor 4 family of cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 5238–5242 (1990).
127. Zlotnik, A. & Yoshie, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* **12**, 121–127 (2000).
128. Jarcho, J. A., Nielsen, O. H. & Ainsworth, M. A. Tumor Necrosis Factor Inhibitors for Inflammatory Bowel Disease. *N. Engl. J. Med.* **369**, 754–762 (2013).
129. Bruns, H., Meinken, C., Schauenberg, P., Härter, G., Kern, P., Modlin, R. L., Antoni, C. & Stenger, S. Anti-TNF immunotherapy reduces CD8+ T cell-mediated antimicrobial activity against Mycobacterium tuberculosis in humans. *J. Clin. Invest.* **119**, 1167–1177 (2009).
130. Agnholt, J., Kelsen, J., Brandsborg, B., Jakobsen, N. O. & Dahlerup, J. F. Increased production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in Crohn's disease – a possible target for infliximab treatment. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **16**, 649–655 (2004).
131. Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 173–182 (2006).

132. Seki, S., Ikarashi, M., Kinoshita, M., Nakashima, M. & Nakashima, H. New Findings about Liver Kupffer Cells / Macrophages , B Cells and their Functions. *J. Hepat. Res.* **1**, 11–13 (2014).
133. Nakashima, H., Kinoshita, M., Nakashima, M., Habu, Y., Shono, S., Uchida, T., Shinomiya, N. & Seki, S. Superoxide produced by Kupffer cells is an essential effector in concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* **48**, 1979–1988 (2008).
134. Kakimi, K., Lane, T. E., Wieland, S., Asensio, V. C., Campbell, I. L., Chisari, F. V & Guidotti, L. G. Blocking chemokine responsive to gamma-2/interferon (IFN)-gamma inducible protein and monokine induced by IFN-gamma activity in vivo reduces the pathogenetic but not the antiviral potential of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **194**, 1755–1766 (2001).

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
-/-	Deletierte Allele
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
AFP	α-Fetoprotein
AIH	Autoimmune Hepatitis
ALT	Alanin-Aminotransferase
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen-präsentierende-Zelle (englisch: antigen presenting cell)
BCR	B-Zell Receptor (englisch: B-cell receptor)
BSA	Bovines Serum Albumin
ca.	circa
CD	Differenzierungsmarker (englisch: cluster of differentiation)
CdH5	cadherin 5
cDNA	Komplementäre DNA
c-FLIP	cellular FLICE inhibitory protein
ConA	Concanavalin A
Cre	Cre-Rekombinase
ct	cycle threshold
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DD	Todesdomäne (englisch: death domain)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch: desoxyribonucleic acid)
DR	Todesrezeptor (englisch: death receptor)
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EC-KO	Knock-Out auf den Endothelzellen (englisch: endothelial cells)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FADD	Fas-associated with death domain
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL/FL, FL	Gefloxt, von LoxP-Erkennungssequenzen flankiert
FSC	Vorwärtsstreulicht (englisch: forward scatter)
g	Gramm
Gal	Galactosamin
GapdH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde(n)
H&E	Hämatoxylin & Eosin
HPF	Lichtfeld (englisch: high power field)
HRP	Meerrettich Peroxidase (englisch: horseradish peroxidase)
i.p.	intra peritoneal
i.v.	intra venös
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin

IU	Internationale Unit(s)
JNK	Jun-N-terminal kinase
kg	Kilogramm
KO	Knock-Out
L	Liter
Laser	Licht-Verstärkung durch stimulierte Emission von Strahlung (englisch: light amplification by stimulated emission of radiation)
LD ₅₀	Mittlere letale Dosis
LPC-KO	Knock-Out auf den Leberparenchymzellen (englisch: liver parenchymal cells)
LPS	Lipopolysaccharid
LSEC	Leber-Endothelzellen (englisch: liver sinusoidal endothelial cells)
LysM	Lysozym M
M	molar
MDC-KO	Knock-Out auf Makrophagen, Monozyten neutrophilen Granulozyten (englisch: myeloid derived cells)
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute(n)
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
n	Anzahl
n.s.	statistisch nicht signifikant
NF-κB	nuclear factor kappa B
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (Pathogen associated molecular pattern)
PBS	Phosphat gepufferte Saline (englisch: phosphate buffered saline)
PBS-T	Phosphat gepufferte Saline mit Tween®20
PCR	Polymerasekettenreaktion (englisch: polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
pg	Pikogramm
pH-Wert	der negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PRR	Pattern recognition receptor
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
qRT-PCR	quantitative real time PCR
rcf	relative centrifugal force
RIP	receptor-interacting protein
RNA	Ribonukleinsäure (englisch: ribonucleic acid)
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies (englisch: reactive oxygen species)
rpm	Umdrehungen pro Minute (englisch: rotation per minute)
RT	Raumtemperatur
SCID	severe combined immune deficiency
SDS	Natriumlaurylsulfat (englisch: Sodium Dodecyl Sulfate)
Sec / s	Sekunde(n)
SEM	standard error of the mean
sog.	sogenannt
SSC	Seitwärtsstreulicht (englisch: side scatter)
t	Zeit
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TC-KO	Knock-Out auf den T-Zellen (englisch: T-Cell)
TCR	T-Zell Rezeptor (T-cell receptor)

TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor Nekrose-Faktor
TNFR1/2	Tumor Nekrose-Faktor Rezeptor 1/2
TRADD	TNF receptor-associated protein with death domain
TRAF	TNF receptor-associated factor
TRAILR	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit(s)
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UV	Ultraviolett
VE-H ₂ O	Voll entsalztes Wasser
VTH	Versuchstierhaltung
WT	Wildtyp
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
α	alpha
α	anti
γ	gamma
Δ	delta

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Lohse möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit in der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf anfertigen zu dürfen.

Herrn PD. Dr. Johannes Herkel danke ich herzlich für die Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten.

Frau Prof. Dr. Julia Kehr danke ich für die kurzfristige Übernahme des Co-Referates.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Hanno Ehlken für die außerordentlich gute Betreuung meiner Doktorarbeit, für die Überlassung dieses spannenden Themas, für die Freiheiten bei der Gestaltung des Projekts, die Möglichkeit selbstständig zu arbeiten, das Vertrauen in mich und meine Fähigkeiten, die stete Diskussionsbereitschaft und die unzähligen Telefonate und Besprechungen rund um mein Projekt.

Bei allen Arbeitskollegen und Mitdoktoranden aus O58 und N27 möchte ich mich herzlich für die schöne Arbeitsatmosphäre, die gute Zusammenarbeit, die tatkräftige Unterstützung und die große Hilfsbereitschaft bedanken. Bei der AG Tiegs (besonders bei Elena) möchte ich mich für die unzähligen ALT-Messungen bedanken. Ebenfalls danke ich der AG Stocking für die Erlaubnis, die hämatologischen Untersuchungen durchführen zu dürfen.

Meinen Freunden danke ich für den nötigen Ausgleich zum Laboralltag.

Meiner Familie danke ich sehr herzlich für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinem Mann für seine unermüdliche (fachliche) Unterstützung bedanken. Ein ganz besonderer Dank gilt ihm dafür, dass er stets aufmunternde Worte gefunden hat, dass er mich immer motiviert und an mich geglaubt hat.

Publikation

Teile dieser Arbeit wurden zur Publikation eingereicht.

OPPOSING ROLE OF TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR 1 SIGNALLING IN T CELL MEDIATED HEPATITIS AND BACTERIAL INFECTION IN MICE

Wroblewski R.*, Armaka M.*, Kondylis V., Pasparakis M., Walczak H., Mittrücker H.-W., Schramm C., Lohse A.W., Kollias G.,¶ and H. Ehlken¶

* These authors share first authorship

¶ These authors share corresponding authorship

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, 30.07.2015

Raluca Wroblewski