

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Biochemie und
Molekulare Zellbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Andreas Guse

Die Rolle vom Liver X Receptor für die Rekrutierung von T Zellen zur Leber

Dissertation

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

vorgelegt von:

Tobias Schmidt
aus Hamburg

Hamburg 2015

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 11.11.2015**

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

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende:

Prof. Dr. Jörg Heeren

Prüfungsausschuss, zweite Gutachterin:

Prof. Dr. Gisa Tiegs

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	6
1.1.1	Funktion und Anatomie der Leber	6
1.1.2	Immunologische Funktion der Leber	7
1.1.3	T Zellen und Lebererkrankungen	8
1.1.4	Chemokine und T Zell Rekrutierung	10
1.2	Liver X Receptor	12
1.2.1	Funktion von LXR im Cholesterin- und Lipidstoffwechsel.....	12
1.2.2	LXR und Entzündung	14
1.3	Fragestellung	16
2.	Material und Methoden	17
2.1	Material	17
2.1.1	Chemikalien	17
2.1.2	Gebrauchsmaterial	17
2.1.3	Arbeitsgeräte	17
2.1.4	Kits und Reagenzien	18
2.1.5	TaqMan Sonden	18
2.1.6	Medien und Lösungen	19
2.2	Zellbiologische Methoden	19
2.2.1	Kultivierung von Zelllinien	19
2.2.2	Isolierung von primären Hepatozyten aus Mauslebern	19
2.2.3	Inkubation der Zellen mit LXR Agonisten und Stimulation mit TNF α	20

2.3	Molekularbiologische Methoden	20
2.3.1	CXCL10 Bestimmung mittels ELISA	20
2.3.2	Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben, Reverse Transkription und quantitative Realtime-PCR	21
2.3.4	Lebertransaminasen Bestimmung	21
2.4	Mausmodelle	21
2.4.1	LXR Gavage und Induktion einer akuten Leberentzündung durch Concanavalin A	22
2.4.2	SAP-IFN γ transgene Maus	22
2.5	Histologie und Immunhistochemie	22
2.6	FACS Analysen	23
2.7	Statistische Auswertung	23
 3. Ergebnisse		
3.1	LXR Aktivierung inhibiert die Bildung proinflammatorischer Chemokine in primären Hepatozyten und humanen Hepatomazellen (HepaRG)	24
3.2	Bedeutung der LXR Aktivierung für die Genexpression von CXCR3 Liganden in einer durch Concanavalin A induzierten akuten Leberentzündung.....	28
3.3	LXR Aktivierung inhibiert die Genexpression proinflammatorischer Chemokine und die Rekrutierung von T Zellen in einem Mausmodel der chronischen Leberentzündung	32

4. Diskussion	
4.1	Mechanismen der anti- inflammatorischen Wirkung von LXR37
4.2	CXCR3 Liganden und die Rekrutierung von T Zellen zur Leber38
4.3	Die Rolle von LXR bei der Rekrutierung von T Zellen zur Leber41
4.4	Möglichkeiten der therapeutischen Anwendung von LXR Agonisten.....43
5. Zusammenfassung44
6. Summary45
7. Abkürzungsverzeichnis46
8. Literaturverzeichnis48
9. Danksagung57
10. Lebenslauf58
11. Eidesstattliche Erklärung59

1. Einleitung

Chronisch entzündliche Lebererkrankungen stellen weltweit ein großes Gesundheitsproblem dar. In den westlichen Industrienationen gehören virale Hepatitiden, Alkohol-bedingte Leberzirrhosen, die metabolische Leberverfettung und autoimmunbedingte Lebererkrankungen zu den häufigsten Lebererkrankungen. In der Pathogenese nahezu aller Lebererkrankungen spielt die chronische Entzündung eine entscheidende Rolle [1, 2]. Eine chronische Entzündung kann eine Vernarbung des Lebergewebes und eine Fibrose zur Folge haben. Die Fibrose kann zur irreversiblen Zirrhose und letztlich zum Organversagen führen, die therapeutisch nur durch eine Lebertransplantation behandelt werden kann. Das Verständnis von Entzündungsprozessen und deren Regulation ist daher für die Entwicklung neuer Therapiekonzepte bei Lebererkrankungen von größter Wichtigkeit.

1.1.1 Funktion und Anatomie der Leber

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan im menschlichen Organismus. Zu den wichtigsten Aufgaben der Leber gehören die Speicherung von Glukose, die Regulation des Lipid- und Energiestoffwechsels, die Produktion von Gerinnungsfaktoren sowie der Abbau und die Ausscheidung von Stoffwechselprodukten und Medikamenten. Um diese Funktionen erfüllen zu können, ist die Leber in der Lage Stoffwechselprodukte, Hormone und Medikamente aus dem Blut aufzunehmen oder ans Blut abzugeben [3]. Zu diesem Zweck verfügt die Leber über eine regulierte Blutzufuhr, die zum einen über die hepatische Arterie zum anderen über die Pfortader erfolgt. Das Blut fließt durch die Sinusoide und verlässt die Leber wieder über die Lebervene. Die Leber besteht aus unterschiedlichen Zelltypen, die sich grob in Parenchym (Hepatozyten) und Nicht-Parenchym Zellen einteilen lassen. Die Leberlobuli sind die strukturellen und funktionellen Einheiten der Leber. Sie bestehen aus hexagonal angeordneten Schichten von ca. 15–25 Hepatozyten, die unter den Lebersinusoiden angeordnet sind. In den Lebersinusoiden befinden sich die Nicht-Parenchym Zellen. Die Wandung der Sinusoide wird von Endothelzellen (LSEC = Leber-sinusoidale Endothelzellen) gebildet. Die LSEC zeichnen sich durch ein fenestriertes Endothel aus, so dass Moleküle aus der Blutzirkulation, die kleiner als 80 nm groß sind, direkt mit den Hepatozyten in Kontakt treten können. Zwischen LSEC und den Hepatozyten befindet sich der Disse'sche Raum, in dem die Vitamin A-speichernden Ito-Zellen (hepatische Sternzellen) liegen. In den

Lebersinusoiden liegen Gewebs-Makrophagen, die in der Leber als Kupffer-Zellen bezeichnet werden [3].

1.1.2 Immunologische Funktion der Leber

Neben einer Vielzahl an metabolischen Funktionen besitzt die Leber auch Aufgaben im Rahmen der Immunabwehr. Aus dem gastrointestinalen Trakt kommendes Blut beinhaltet potentielle Antigene, die sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem aktivieren können. Von besonderer Bedeutung bei der Aktivierung des angeborenen Immunsystems in der Leber sind die Kupffer-Zellen [4]. Diese Zellen wurden erstmals 1876 von Karl Wilhelm von Kupffer als abgrenzbare Leberzellpopulation beschrieben. Die Kupffer-Zellen befinden sich im Lumen der Lebersinusoiden und gehören daher zu den ersten Zellen, die mit Antigenen aus dem gastrointestinalen Trakt in Berührung kommen [3]. Die Kupffer-Zellen detektieren Pathogene vor allem durch die Pattern-recognition-receptors (PRR), zu denen auch die Toll-like receptors (TLR) gehören. Diese Rezeptoren erkennen spezifische Strukturen, die Pathogen-associated molecular pattern (PAMP) genannt werden, auf eindringenden Pathogenen [5]. TLR initiieren eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade und führen zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Nuclear-factor-kappa-B (NF κ B) und Activator-Protein 1 (AP1), welche wiederum die Transkription pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine, wie Tumornekrosefaktor alpha (TNF α), Interferon gamma (IFN γ), Interleukin-1 beta (IL-1 β) und Interleukin-6 (IL-6) aktivieren. Neben den PRR sind in den letzten Jahren weitere zyttoplasmatische Rezeptoren entdeckt worden, wie die Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD-like) Rezeptoren, die ebenfalls zu einer NF κ B- und AP1-Aktivierung führen [5]. Die sezernierten Zytokine und Chemokine wirken chemotaktisch auf Lymphozyten und initiieren so eine spezifische Immunantwort. Zusätzlich sekretieren die Kupffer-Zellen reaktive Oxide, Superoxide und Stickstoffoxide, welche direkt toxisch auf pathogene Organismen wirken [6]. Neben Kupffer-Zellen exprimieren eine Vielzahl weiterer Zellen in der Leber TLR, dazu gehören Hepatozyten, LSEC, Ito-Zellen, hepatische dendritische Zellen und Natürliche Killer-(NK)-Zellen [7]. Von den Kupffer-Zellen sezerniertes TNF α und IFN γ aktiviert die Transkription pro-inflammatorischer Gene in Hepatozyten. Die vermehrt sezernierten Zytokine und Chemokine tragen ebenfalls zur Rekrutierung von Immunzellen des adaptiven Immunsystems bei [8]. Das Zusammenspiel von TLR und TLR-Liganden ist somit essentiell

für die Regulation immunologischer Prozesse in der Leber. Da mikrobielle Antigene der Darmflora ständig über die Pfortader zu den Leberzellen transportiert werden, muss die Immunantwort streng reguliert werden. Die Induktion einer Toleranz gegenüber den Antigenen wird dabei über unterschiedliche Mechanismen vermittelt. So führt die wiederholte Exposition gegenüber einem Antigen auf Antigen-präsentierenden Zellen zu einer abgeschwächten Aktivierung von T-Zellen. Von entscheidender Bedeutung für die Toleranzinduktion in der Leber sind dabei Regulatorische T-Zellen (T_{reg}), welche über die Sekretion bestimmter Zytokine und Chemokine zu einer Suppression der Immunantwort führen können [9]. Bei vielen Lebererkrankungen wurde eine erhöhte Expression und Aktivierung von TLR beschrieben [10], deren Ursachen noch nicht gänzlich erforscht sind. In den letzten Jahren wurde der intestinalen Darmflora eine besondere Rolle zugeschrieben. Eine gestörte Interaktion von Immunzellen und den Darm kolonisierenden Keimen führt zu einer gesteigerten Aktivierung von TLR in residenten Leberzellen und trägt zum Zusammenbruch der immunologischen Toleranz bei. Diese Interaktion scheint besonders bei der Pathogenese der nicht-alkoholischen Steatohepatitis von großer Bedeutung zu sein [11].

1.1.3 T Zellen und Lebererkrankungen

Das adaptive Immunsystem ist durch besondere Charakteristika gekennzeichnet, dazu gehören Antigenspezifität, Rezeptordiversität, Selbstregulation und Toleranzausbildung. Die zentralen Zellen des adaptiven Immunsystems sind B- und T-Lymphozyten. Die zwei durch die Zelloberflächenproteine CD-(cluster of differentiation)-4 und CD8 gekennzeichneten Untergruppen von T-Zellen besitzen unterschiedliche Funktionen [12]. Der Antigenrezeptor der T-Lymphozyten erkennt von Major-Histocompatibility-Complex-(MHC)-Molekülen präsentierte Antigenpeptide. Dabei binden CD4-Zellen an MHC-II-Moleküle und CD8-Zellen an MHC-I-Moleküle. MHC-I-Moleküle werden auf vielen unterschiedlichen Zelltypen exprimiert und präsentieren vorwiegend Peptide viraler Proteine. Binden CD8⁺-T-Zellen an die MHC-I-Antigenpeptid-Komplexe wirken sie zytotoxisch auf die Antigen-präsentierenden Zellen [13]. Auch Hepatozyten exprimieren MHC-I-Moleküle, allerdings in sehr geringe Mengen [13]. Die Funktion von CD4⁺-T-Zellen ist dagegen die Aktivierung anderer Zellen des Immunsystems. MHC-II-Moleküle werden daher auch ausschließlich von Immunzellen exprimiert [12]. Erkennen CD4⁺-Zellen MHC-II-Antigenpeptid-Komplexe auf B-Zellen, so aktivieren sie diese zur Antikörperproduktion [14]. CD4⁺-Zellen sind in den letzten Jahren in

den Fokus der Forschung geraten, da sie entscheidend an der Regulation der Immuntoleranz beteiligt sind. Generell können CD4⁺-Zellen nach dem Profil der sekretierten Zytokine und ihren biologischen Funktionen in zwei Untergruppen unterteilt werden, Th1- und Th2-Zellen [15]. Th1-Zellen sind direkt an der Immunantwort gegen intrazelluläre Bakterien und Viren beteiligt. Th1-Zellen sekretieren vor allem IFN γ , welches wiederum auf Makrophagen wirkt und diese zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und zytotoxischer Mediatoren anregt. Gleichzeitig steigert IFN γ die Expression von MHC-I- und MHC-II-Molekülen auf immunkompetenten Zellen und bewirkt dadurch eine Verstärkung der Immunantwort [16]. Von Th1-Zellen sezerniertes IL-2 stimuliert in einem autokrinen Loop die Proliferation der Th1-Zellen. Th2-Zellen sind in die Immunantwort gegen Parasiten involviert und sezernieren die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13. Th2-Zellen können über den CD40-Rezeptor mit B-Zellen interagieren und diese zur Produktion von Antikörpern anregen [17]. Gleichzeitig wirkt IL-4 inhibierend auf die Th1-Zellproliferation. Damit können Th2-Zellen die Immunantwort der Th1-Zellen begrenzen.

In den letzten Jahren sind zwei weitere Untergruppen an T-Zellen beschrieben worden. Th17-Zellen unterscheiden sich von Th1- und Th2-Zellen durch die Sekretion von IL-17A, IL-17F, IL-21 und IL-22. IL-17A und IL-17F bewirken die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten und können außerdem Nicht-Immunzellen zur Sekretion von pro-inflammatorischen Mediatoren anregen [18]. Th17-Zellen scheinen wesentlich an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen beteiligt zu sein [19]. Eine Studie konnte erhöhte Serumspiegel von IL-17 und eine erhöhte Frequenz von Th17-Zellen bei Patienten mit Autoimmunhepatitis zeigen [20]. Eine weitere Gruppe von CD4⁺-T-Zellen sind die Regulatorischen T-Zellen (T_{reg}), die sich durch ihre Funktion elementar von Th1- und Th2-Zellen unterscheiden. Aktivierte T_{reg} sezernieren die anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und Transforming-growth-factor-beta (TGF β) und können dadurch Immunreaktionen unterdrücken [9]. Die Differenzierung von T_{reg} erfolgt unter dem Einfluss von TGF β und wird durch pro-inflammatorische Zytokine gehemmt. T_{reg} sind durch die Expression des Transkriptionsfaktors Forkhead-Box-Protein-P3 (FoxP3) gekennzeichnet [21]. Auch für T_{reg} ist eine Beteiligung an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen beschrieben. Bei Patienten mit Autoimmunhepatitis wurden eine erniedrigte Anzahl von T_{reg} gefunden [22]. Th17-Zellen und T_{reg} haben entgegengesetzte Funktionen. Ein Gleichgewicht der beiden T-Zell-Populationen scheint essentiell für die Stabilität der Immuntoleranz zu sein. Daher wird

vermutet, dass eine Störung des Gleichgewichts bei der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle spielt [23].

1.1.4 Chemokine und T Zell Rekrutierung

Die Rekrutierung von Immunzellen zur Leber wird durch Chemokine reguliert [8]. Chemokine sind lösliche Immunmediatoren, die auch von nicht-myeloiden Zellen sezerniert werden. Zu diesen Zellen zählen auch Hepatozyten. Chemokine sind neben der Rekrutierung von Immunzellen ebenfalls an der Regulation der Angiogenese, der Zellproliferation und an der Apoptose beteiligt [24]. Kommt es nach einer Aktivierung von TLR durch die entsprechenden Liganden zu einer vermehrten Sekretion von Chemokinen, wirken diese chemotaktisch auf Immunzellen. Mittlerweile sind eine Vielzahl von Chemokinen und Chemokin-Rezeptoren bekannt [Tab. 1]. Diese Diversität erlaubt eine zielgenaue Rekrutierung von bestimmten Immunzellen. Für die spezifische Rekrutierung von T-Zellen zur Leber und für die transendotheliale Migration scheint vor allem der Chemokin-Rezeptor CXCR3 entscheidend zu sein [25]. Mit den Chemokinen CXCL9, CXCL10 und CXCL11 sind drei Liganden für den CXCR3 beschrieben. Diese können durch $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ induziert in der Leber von Hepatozyten, Ito-Zellen, LSEC und durch Leukozyten sezerniert werden [26]. Die Expression des CXCR3-Rezeptors ist vor allem für die Rekrutierung von Th1-Zellen von Bedeutung. Leber infiltrierende Th1-Zellen zeigen verglichen mit peripheren T-Zellen im Blut eine hohe Expression von CXCR3 [27]. Die Liganden des CXCR3 spielen allerdings auch eine Rolle bei der Rekrutierung von T_{reg} [28]. Viele Studien belegen eine erhöhte Expression von CXCR3-Liganden bei chronischen Lebererkrankungen. Beispielsweise wurden erhöhte Spiegel bei Patienten mit primärer biliärer Zirrhose und chronischer Hepatitis C gefunden [29, 30].

Chemokin Rezeptor	Chemokin	Funktion	Zellen
CXC Gruppe			
CXCR1	CXCL6,CXCL7, CXCL8	Neutrophilen Rekrutierung, angeborenes Immunsystem, Akute Inflammation	Monozyten, Mastzellen
CXCR2	CXCL1-3,CXCL5- 8	Neutrophilen Rekrutierung, angeborenes Immunsystem, Akute Inflammation	Monozyten, Mastzellen
CXCR3	CXCL9,CXCL10, CXCL11	T Zellen Rekrutierung	T Zellen, Th1, Th2, Th17, Treg
CXCR4	CXCL12	Stammzellen Migration, B Zell Reifung	T Zellen, B Zellen, Makrophagen, Stammzellen
CXCR5	CXCL13	B Zellen Rekrutierung	B Zellen
CXCR6	CXCL16	T Zellen Migration	Th1 Zellen, NK Zellen
CC Gruppe			
CCR1	CCL3,CCL5, CCL7,CCL8, CCL13-16, CCL23	angeborenes und adaptives Immunsystem, T Zellen und Monozyten Rekrutierung	Monozyten, T Zellen, NK Zellen
CCR2	CCL2,CCL7, CCL8, CCL13	T Zellen und Monozyten Rekrutierung, angeborenes und adaptives Immunsystem	
CCR3	CCL5,CCL7, CCL11,CCL15, CCL16,CCL24, CCL26,	Rekrutierung von eosinophilen und basophilen Granulozyten, Allergie, Th2 Zellen	Eosinophilen und basophilen Granulozyten
CCR4	CCL17, CCL22,	T Zellen und Monozyten Migration, Allergische Entzündungen,	Th2 Zellen, Treg, Eosinophilen und basophilen Granulozyten
CCR5	CCL3,CCL4, CCL5, CCL8	Th1 Rekrutierung	Monozyten, Th1 Zellen, NK Zellen
CCR6	CCL20	Rekrutierung von Dendritischen Zellen	B Zellen, Th17 Zellen
CCR7	CCL19, CCL21	Rekrutierung von Dendritischen Zellen und T Zellen zu Lymphknoten	B Zellen, T Zellen
CCR8	CCL1	Th2 Rekrutierung	Th2 Zellen, Treg
CCR9	CCL25	T Zell Rekrutierung im Darm und Thymus	T Zellen
CCR10	CCL27, CCL28	T Zell Rekrutierung zur Haut	T Zellen, Treg

Tab. 1: Funktion von Chemokinen und Chemokin-Rezeptoren im menschlichen Immunsystem

Chemokine können anhand der Positionen von Cystinen in unterschiedliche Klassen eingeteilt werden. Bei CC Chemokinen liegen zwei Cysteine nebeneinander, bei den CXC Chemokinen sind diese durch eine Aminosäure getrennt. Tabelle modifiziert nach Ye und Adams, Journal of Autoimmunity 2010.

1.2 Liver X Receptor

Liganden aktivierbare Transkriptionsfaktoren bilden eine große Familie von Transkriptionsfaktoren, die eine Vielzahl biologischer Prozesse regulieren und wichtige Funktionen im Energie-, Fett- und Zuckerstoffwechsel erfüllen. Ein bekannter und gut beschriebener Liganden aktivierbarer Transkriptionsfaktor ist der Östrogen-Rezeptor. Dieser befindet sich im nicht-aktivierten Zustand im Zytosol an Heat-Shock-Proteine (HSP) gebunden. Nach Bindung von 17- β -Östradiol kommt es zu einer Konformitätsänderung des Rezeptors und dadurch zu einer Lösung der HSP. Dies wiederum führt zu einer Zusammenlagerung zweier Östrogen-Rezeptoren zu einem Homodimer und zu einer Translokation in den Zellkern. Dort lagert sich der Komplex an Estrogen-Response Elements in der Promotorregion von bestimmten Zielgenen an die Desoxyribonukleinsäure (DNA) an und kann auf dieser Weise die Transkription dieser Gene regulieren [31]. Dabei kann der Rezeptorkomplex sowohl aktivierende als auch repressive Wirkungen auf die Genexpression ausüben. Einige nukleäre Rezeptoren können nach Liganden Bindung auch einen Heterodimer mit einem anderen nukleären Rezeptor bilden. Zu den Liganden aktivierbaren Transkriptionsfaktoren gehören auch die Liver-X-Receptors α und β (LXR). Diese wurden zunächst als „Orphan-Receptors“ beschrieben, da die Liganden nicht bekannt waren. In der Folge wurden vor allem Oxysterole als physiologische Liganden identifiziert [32]. Oxysterole sind Derivate des Cholesterins. Cholesterin selber bindet aber nicht an LXR. LXR α und LXR β sind strukturell zu ca. 80 % homolog, zeigen aber eine unterschiedliche Gewebeexpression. Während LXR α vor allem in der Leber, im Fettgewebe und in Makrophagen vorkommt, wird LXR β ubiquitär exprimiert [33]. Neben Oxysterolen konnten auch synthetische Agonisten identifiziert werden. Der am häufigsten verwendete LXR-Agonist ist T0901317, der LXR α und LXR β bei sehr geringen Konzentrationen aktiviert. T0901317 ist kein selektiver LXR-Agonist, sondern aktiviert auch den Pregnan-X-Rezeptor (PXR) und den Farnesoid-X-Rezeptor (FXR). Die Affinität von T0901317 zu PXR und FXR ist allerdings um ein Vielfaches geringer als zu LXR α und LXR β [35,36].

1.2.1 Funktion von LXR im Cholesterin- und Lipidstoffwechsel

LXR regulieren eine Vielzahl von Genen des Cholesterin- und Lipidstoffwechsels [Tab. 2]. Intrazellulär fungieren LXR als Cholesterin-Sensoren und führen nach Aktivierung durch

Oxysterole zu einer gesteigerten Expression von Proteinen des Cholesterin-Transports. LXR formen einen Komplex mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) und können so als Heterodimer an bestimmte LXR-sensitive Regionen der DNA binden. Nach Aktivierung durch einen Liganden kommt es zu einer Konformitätsänderung des Komplexes und zu einer Ablösung von Korepressoren, wie dem Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor (SMRT) und dem Nuclear receptor corepressor (NCoR). Danach wird die Transkription der Zielgene gestartet [37]. In Makrophagen induziert LXR über diesem Mechanismus nach Aktivierung durch Oxysterole aus oxidierten Low-density-Lipoproteinen (LDL) die Transkription von Genen, die beim reversen Cholesterin-Transport eine Rolle spielen. Dazu gehören der ABCA1 (ATP-binding cassette sub-family A member 1), ABCG1 (ATP-binding cassette sub-family G member 1) und ApoE (Apolipoprotein E) [38]. Damit wird der Transport von Cholesterin aus der Peripherie zur Leber ermöglicht. Eine entscheidende Rolle dabei spielt ABCA1, welches zu den am stärksten durch LXR regulierten Genen zählt [39]. ABCA1 fördert den Efflux von Cholesterin aus Makrophagen ins Plasma, wo dann eine Übertragung von Cholesterin auf Lipid-armes ApoA1 stattfindet. Nach weiteren Lipidtransferreaktionen, die durch verschiedene intravaskuläre Enzyme wie das Cholesterinestertransferprotein (CETP) katalysiert werden, werden dann die Cholesterin-reichen High-density Lipoproteine (HDL) zur Leber transportiert [40]. Patienten mit ABCA1-Mutationen haben nahezu keine HDL und zeigen eine gesteigerte Ablagerung von Cholesterin in Gefäßwänden [41]. Einige Studien zeigen einen protektiven Effekt von LXR auf die Entwicklung von Arteriosklerose. So reduziert die systemische Gabe von LXR-Agonisten die Entstehung einer Atherosklerose in zwei unterschiedlichen Mausmodellen [42]. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine LXR-Aktivierung die Plasmaspiegel von HDL erhöhen [43]. In der Leber reguliert LXR die Umwandlung von Cholesterin in Gallensäuren über die Expression des Schrittmacherenzym Cytochrom P450 7A1 (CYP7A1) [44]. Bei LXR α -defizienten Mäusen kommt es zu einer massiven Akkumulation von Cholesterin in der Leber [45]. Neben der Regulation des Cholesterinstoffwechsels ist LXR in der Leber auch von entscheidender Bedeutung für die Lipogenese. Durch Stimulation der Genexpression von *Sterol regulatory element-binding protein 1 isoform c* (SREBP1c) und folgender Induktion der Fettsäuresynthese (FAS) kommt es zu einer gesteigerten Produktion von Fettsäuren [46]. Mit LXR-Agonisten behandelte Mäuse entwickeln daher eine starke Hypertriglyzeridämie, da die gebildeten Fettsäuren in Triglyzeride umgewandelt werden, die dann die hepatische Produktion der Triglyzerid-reichen VLDL steigern. Für die Induktion der Lipogenese wird vor allem die Aktivierung von LXR α verantwortlich gemacht [44,46]. Im Darm bewirkt die

Aktivierung von LXR eine Inhibition der Cholesterin-Absorption über eine vermehrte Re-Sekretion von Cholesterin in das Darmlumen [47]. Dieser Effekt wird vor allem über die Regulation der Expression von ABCG5 und ABCG1 vermittelt.

Stoffwechsel	Gen Name	Funktion
Reverser Cholesterin Transport	ABCA1	Efflux
	ABCG1	Efflux
	ARL7	Efflux, Transport
Regulation von Cholesterin Transport	LPL	Triglyceride Hydrolyse
	ApoE	Transport
Absorption und Sekretion von Cholesterin im Darm	ABCA1	Efflux
	ABCG5	Efflux
	ABCG8	Efflux
Regulation von Fettsäuren und Triglyceride Synthese	SREBP1C	Fettsäuren und Triglyceride Synthese
	SCD1	Synthese von ungesättigten Fettsäuren
	FAS	Synthese von Fettsäuren
	ApoC2	Aktivierung von LPL
Gallensäuren Metabolismus	CYP7A1	Konversion von Cholesterin zu Gallensäure
Glucose Stoffwechsel	GLUT4	Insulin abhängige Glucose Aufnahme

Tab. 2.: Bekannte Liver X Rezeptor Zielgene

Liver X Rezeptor ist an der Regulation zahlreicher Gene des Cholesterin-, Fett-, Gallensäuren-, und Zuckerstoffwechsel beteiligt. Tabelle modifiziert nach Calkin und Tontonoz, Nature Reviews Mol Cell Biol 2012

1.2.3 LXR und Entzündung

Neben der Bedeutung von LXR für den Lipidstoffwechsel, zeigen eine Reihe an Studien einen regulatorischen Einfluss von LXR α und LXR β auf Entzündungsprozesse. 2003 wurde erstmals ein inhibitorischer Einfluss der LXR-Aktivierung auf Entzündungsmediatoren beschrieben. In dieser Studie hemmt der synthetische LXR-Agonist GW3965 konzentrationsabhängig die durch Lipopolysaccharide (LPS) induzierte iNOS (induzierbare Form der Nitric oxide synthase), Cyclooxygenase-2 (COX-2) und IL-6-messenger-ribonucleic-acid-(mRNA)-Expression in Makrophagen [49]. Als möglicher Mechanismus wurde in der Studie eine antagonistische Wirkung auf die Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP1 identifiziert. 2006 beschrieben Pascual et al. [50] einen neuen Mechanismus der Genregulation, der als Transrepression bezeichnet wird. Nach TLR4-Aktivierung durch LPS

löst sich ein Rezeptor-Komplex bestehend aus Nuclear receptor co-repressor 1 (NCoR), Transducin β -like protein 1 (TBL1) und Transducin β -like 1-related protein (TBLR1) von Promoter-Regionen pro-inflammatorischer Gene. Wird allerdings der Kernrezeptor durch einen Liganden aktiviert, so wird ein Sumo-(small ubiquitin-related modifier)-Protein an den Kernrezeptor angehängt, welcher dann an den NCoR-Rezeptor-Komplex bindet, dessen Bindung an die DNA stabilisiert und damit die Genexpression pro-inflammatorischer Gene supprimiert. Dieser Mechanismus wurde zuerst für den Peroxisome-proliferated-receptor- γ (PPAR γ) beschrieben. Hierbei bindet PPAR γ an das SUMO1-Protein. 2007 wurde ein paralleler Mechanismus für LXR beschrieben. Nach Aktivierung des LXR durch einen Liganden wird ein SUMO2/3-Protein angehängt, was die Bindung an den NCoR-Komplex ermöglicht. Inzwischen wurde eine große Anzahl von LXR-abhängigen Genen beschrieben, die über den Mechanismus der Transrepression insbesondere in Makrophagen die Synthese pro-inflammatorischer Gene reduziert [51]. Auch *in vivo* konnte in unterschiedlichen Modellen eine anti-inflammatorische Wirkung von LXR gezeigt werden. So reduziert die LXR-Aktivierung die Entzündungsreaktion und Demyelinisierung in einem Mausmodell der autoimmunen Enzephalomyelitis [52]. Darüber hinaus spielt LXR eine anti-inflammatorische Rolle in einem Modell der allergischen Kontaktdermatitis [53].

1.4 Fragestellung

In dieser Arbeit sollte die immunregulatorische Rolle von LXR in der Leber untersucht werden. Die Hypothese war, dass eine Aktivierung von LXR durch spezifische Liganden die Genexpression von pro-inflammatorischen Genen inhibieren und damit eine Rekrutierung von Immunzellen zur Leber verhindern kann.

Zunächst sollte der Einfluss der LXR-Aktivierung auf die Genexpression pro-inflammatorischer Gene in Zellkulturexperimenten mit Hepatozyten untersucht werden. Mit Hilfe von unterschiedlichen Mausmodellen der Leberentzündung sollte dann *in vivo* eine mögliche inhibitorische Wirkung auf die Rekrutierung von T-Zellen analysiert werden.

Die Klärung dieser Fragestellung soll einen Beitrag zu einem besseren Verständnis pathophysiologischer Vorgänge in der Leber leisten. Langfristig könnte sich auf der Basis dieser Ergebnisse die Möglichkeit der therapeutischen Nutzung von LXR-Agonisten bei Lebererkrankungen eröffnen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1 Chemikalien

BSA (Bovine Serum Albumin)	Serva, Heidelberg
Chloroform	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol 96%	Merck, Darmstadt

2.1.2 Gebrauchsmaterial

12- Well-Zellkultur-Platten	Nunc™, VWR, Darmstadt
Kanülen	Braun, Melsungen
Mikrotiterplatten (96-Well-Format)	Nunc™, VWR, Darmstadt
PCR-Tubes	Sarstedt, Nümbrecht
Pipetten	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß 15 ml	BD Falcon, Heidelberg
Spritzen	Braun, Melsungen
Stabpipetten	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.3 Arbeitsgeräte

CASY Cell Counter, Model TT	Schärfe System, Reutlingen
CO2-Inkubator für Zellkultur	Binder, Tuttlingen
Lichtmikroskop	Zeiss, Aalen
Nanodrop	Peqlab, Erlangen
Operationsbesteck	Aesculap, Braun, Melsungen
Thermocycler	Biometra Göttingen
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg

Tissue Lyser QIAGEN, Hilden

2.1.4 Kits und Reagenzien

Anti/Anti	GIBCO/BRL, Eggenstein
ELISA CXCL10	R&D Systems, Abingdon, UK
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, USA
Foetal Bovine Serum Gold	PAA, Deutschland
Hydrocortisol	Sigma- Aldrich, München
Insulin	Sigma- Aldrich, München
Mastermix TaqMan	Eurogentec, Deutschland
Natriumchlorid 0,9 %	Braun, Melsungen
NucleoSpin RNA II	Macherey und Nagel, Düren
PBS	GIBCO, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)	GIBCO, Eggenstein
T0901317	Cayman, Deutschland
TNF α	Sigma- Aldrich, München
William's E + Gluta max	Gibco, Eggenstein

2.1.5 TaqMan Sonden

Gen	Assay
hABCA1	Hs01059137_m1
hCXCL10	Hs00171042_m1
hLXRalpha=hNR1H3	Hs00172885_m1
hLXRbeta=hNR1H2	Hs00173195_m1
mABCG1	Mm00437390_m1
mABCG5	Mm00446249_m1
mCXCL9	Mm00434946_m1
mCXCL10	Mm00445235_m1
mCXCL11	Mm00444662_m1
mCD4	Mm00442754_m1
mFAS	Mm00662319_m1

2.1.6 Medien und Lösungen

Kulturmedium:

Williams' Media E + GlutaMAX™

10 % FBS- Gold

2 % Anti Anti

5 µg/mL Hydrocortison

100 µg/mL Insulin

Hungermedium:

DMEM + GlutaMAX™

0,1 % BSA

1 % Anti-Anti

2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung von Zelllinien

Im ersten Teil der Arbeit wurde *in vitro* die Wirkung einer LXR-Aktivierung auf die Genexpression pro-inflammatorischer Chemokine untersucht. Hierfür wurde die humane Zelllinie HepaRG genutzt, die ein sehr ähnliches Genexpressionsmuster wie primäre humane Hepatozyten besitzt [54]. Im Gegensatz zu anderen Leberzelllinien wie HepG2 zeigen HepaRG-Zellen vor allem eine hohe Expression von verschiedenen CYP (u. a. CYP1A2, CYP2B6 und CYP3A4) sowie von Kernrezeptoren, wie PXR, PPAR α und LXR [55]. Für diese hohe Expression von Leber-spezifischen Genen wurden HepaRG-Zellen 28 Tage in einem speziellen Nährmedium aus William's E + GlutaMAX (GIBCO) mit Zusatz von 10% FBS-Gold, 2% Antibiotic-Antimycotic, Hydrocortison (5 µg/mL) und Insulin (100 µg/mL) in 12 well plates kultiviert.

2.2.2 Isolierung von primären Hepatozyten aus Mausebern

Die Isolierung von primären Hepatozyten aus Mausebern erfolgte nach einem im Labor etablierten Protokoll. Die Mäuse wurden mittels intraperitonealer Injektion einer

Rompun/Ketanest-haltigen Narkose-Lösung betäubt und anschließend der Bauchbereich der Maus geöffnet. Die Leber wurde über die Pfortader mit einer EDTA-haltigen Perfusionslösung für etwa eine Stunde perfundiert. Nach der Perfusion wurde die Leber entnommen und in eine Zellkulturschale transferiert. Mit Hilfe einer Pinzette wurden die Zellen herausgelöst und die Zellsuspension durch ein Zellsieb (Porengröße 70 µm) in ein 50 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden anschließend für 4 Minuten bei 28 g mittels Zentrifugation sedimentiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 8 ml Nährmedium aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde dann mit 13,9 ml Percoll-Dichtegradienten-Lösung und 2,1 ml 10 x Perfusionspuffer versetzt. Anschließend erfolgte ein zweiter Zentrifugationsschritt für 6 min bei 855 g in derselben Zentrifuge. Die Zellen lagen nun im Pellet vor. Dieses wurde in 10 ml Nährmedium aufgenommen und vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Die Zellen wurden dann in der gewünschten Dichte auf entsprechenden Zellkulturplatten ausgesät. Eine Stunde nach dem Aussetzen wurde das Medium gewechselt. Die Hepatozyten wurden vier Stunden nach der Aussaat für Experimente verwendet.

2.2.3 Inkubation der Zellen mit LXR Agonisten und Stimulation mit TNF α

28 Tage differenzierte HepaRG Zellen und primäre Hepatozyten wurden 3x mit PBC gewaschen und im Hungermedium mit unterschiedlichen Konzentrationen mit T0901317 bei 37° für 1 Stunde inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 2 ng/ml TNF α für 4 Stunden.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 CXCL10 Bestimmung mittels ELISA

Die Konzentration von CXCL10 wurde mit Hilfe eines kommerziellen Kits (DuoSet, R&D) im Zellkultur-Überstand bestimmt. Dazu wurden Microtiterplatten mit dem ersten Antikörper über Nacht beschichtet, nicht belegte Bindungsstellen mit BSA (1% in Waschpuffer) blockiert und 2 h mit den Proben inkubiert. Die Detektion erfolgte mit Peroxidase-gekoppelten Antikörpern und einer TMB Substratlösung. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 M H₂SO₄ (0,5x Volumen) gestoppt und die Intensität bei einer Wellenlänge von 450 nm

ausgelesen. Als Standard zur Quantifizierung diente eine Verdünnungsreihe des rekombinanten Proteins.

2.3.2 Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben, Reverse Transkription und quantitative Realtime-PCR

RNA aus Zellen oder Gewebe wurde mittels Trizol und im Falle von Gewebe mit einem TissueLyzer (Qiagen) und mit Hilfe des kommerziellen Kits NucleoSpin RNA II Kit (Macherey & Nagel) isoliert. Die Messung der RNA Konzentration erfolgte am NanoDrop. 1 µg RNA wurden in 50 µL Reaktionsvolumen mit High Capacity cDNA RT Kit (Invitrogen) umgeschrieben. Die cDNA wurde 1/5 mit RNAase freiem Wasser verdünnt und eine Quantitative Real-Time PCR zur Expressionsanalyse wurde mit einem 7900HT Detektionssystem (Applied Biosystems) und TaqMan Assay-on-Demand Primer-Sonden-Paaren (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode und dem Haushältergen Tbp (murine Gene) bzw. TAF1 (humane Gene) errechnet.

2.3.4 Lebertransaminasen Bestimmung

Die Konzentration der Leber-Enzyms ALT und AST wurde freundlicherweise im Forschungslabor der 1. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf in Kooperation mit Dorothee Schwinge, AG Prof. Dr. Schramm durchgeführt. Die Messung erfolgte mit Hilfe des Hitachi Modular E170 Analyzer (Boehringer Mannheim, Deutschland).

2.4. Mausmodelle

Die Tierexperimente wurden mit Genehmigung des Tierschutzkomitees des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und der Behörde für Wissenschaft und Gesundheit (Stadt Hamburg) durchgeführt.

2.4.1 LXR Gavage und Induktion einer akuten Leberentzündung durch Concanavalin A

Zur Analyse der inhibitorischen Wirkung von LXR auf die T Zell Rekrutierung *in vivo*, wurde ein etabliertes Modell einer starken akuten Leberentzündung genutzt. In diesem Modell kommt es nach Injektion von ConA zu einer massiven Infiltration von T-Zellen in die Leber [55]. Für das ConA-Modell der akuten Leberentzündung ist eine starke Expression von CXCR3-Liganden und eine hohe Anzahl von infiltrierenden CD4⁺-Th1-Zellen beschrieben [56]. In dem durchgeführten Experiment wurden zehn Wochen alte C57BL6/J Mäuse zweimalig im Abstand von 24 Stunden mit 50 mg/kg/d T0901317 (Cayman, Deutschland) per Gavage behandelt. Dazu wurde das T0901317 in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und mit Kochsalzlösung verdünnt. Die Kontrollgruppen erhielten eine Gavage des Lösungsmittels. Acht Stunden nach der zweiten Gavage wurde Concanavalin A (ConA; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) intravenös injiziert. Die Mäuse erhielten eine einzelne Dosis von 10 mg/kg in einem Volumen von 100µl/10g Maus. Der Kontrollgruppe wurde 0,9 %ige Kochsalzlösung injiziert. Sechs Stunden nach ConA-Injektion wurden die Mäuse sakrifiziert.

2.4.2 SAP IFN γ transgene Maus

Zur Untersuchung der Wirkung einer LXR Aktivierung in einem Modell der chronischen Leberentzündung, wurde ein Experiment mit IFN γ -transgenen Mäusen durchgeführt, welche Leberspezifisch IFN γ überexprimieren und im Alter von zehn Wochen eine milde Leberentzündung entwickeln [57]. Die leberspezifische Überexpression wird in dem Modell durch die Verbindung des IFN γ -Gens mit der Promoter-Region vom Serum Amyloid P (SAP) Gen erreicht. Neun Wochen alte SAP-IFN γ -Mäuse wurden sieben Tage mit 50 mg/kg/d T0901317 (Cayman, Deutschland) gefüttert. Hierzu wurde das T0901317 in Ethanol gelöst, über ein Standardfutter pipettiert und über Nacht abgedampft. Nach sieben Tagen wurden die Mäuse sakrifiziert und das Serum und die Lebern analysiert.

2.5 Histologie und Immunhistochemie

Zur histologischen Untersuchung der T-Zell-Infiltration wurden die Paraffin-Schnitte im Forschungslabor der 1. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf in Kooperation mit Dorothee Schwinge, AG Prof. Dr. Schramm, mit einem rat anti-human CD3-Antikörper (Serotec, United Kingdom) und einem POLAR Kit (ZytoMed, Deutschland) markiert.

2.6 FACS Analysen

Die FACS-(fluorescence-activated cell sorting)-Analysen erfolgten nach einem etablierten Protokoll im Institut für Experimentelle Immunologie und Hepatologie, Leitung Prof. Dr. rer. nat. Gisa Tiegs. Nicht-Parenchymzellen der Leber wurden durch mechanische Zerkleinerung und PBS-Perfusion isoliert und mit Antikörper gegen CD3, CD4, FOXP3 und CD25 gefärbt. Die FACS-Daten wurden mit der FACS Diva Software (BD Biosciences, Deutschland) analysiert.

2.7. Statistische Auswertung

Für Vergleiche von zwei Gruppen wurde die statistische Signifikanz mit Hilfe des zweiseitigen, ungepaarten Student-T-Tests analysiert. Die Daten der Mausgruppen wurden mittels one way-ANOVA (analysis of variance) mit dem Statistik-Programms Prism auf statistische Signifikanz untersucht. Bei einem $p < 0,05$ wurde statistische Signifikanz angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 LXR Aktivierung inhibiert die Bildung proinflammatorischer Chemokine in primären Hepatozyten und humanen Hepatomazellen (HepaRG)

Im ersten Teil der Arbeit wurde *in vitro* die Wirkung von LXR Aktivierung auf die Genexpression proinflammatorischer Chemokine untersucht. Hierfür wurde die humane Zelllinie HepaRG 28 Tage in einem speziellen Nährmedium differenziert. Zunächst wurde die Expression von LXR α und LXR β in differenzierten HepaRG-Zellen bestimmt [Abb. 1]. Beide LXR-mRNA-Subtypen wurden von den Zellen gebildet, wobei LXR α erwartungsgemäß in höheren Mengen exprimiert wurde.

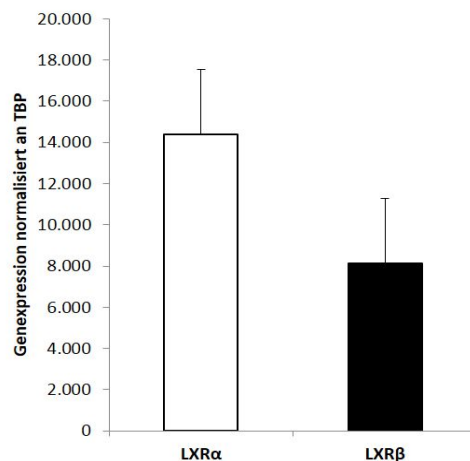


Abb. 1: Expression von LXR α und LXR β in HepaRG-Zellen

HepaRG-Zellen wurden 28 Tage differenziert. Die Genexpression wurde mittels qPCR quantifiziert (n = 2, Mittelwert \pm SD). Die Daten sind exemplarisch für zwei unabhängige Experimente.

Um die Auswirkung einer LXR-Aktivierung in differenzierte HepaRG-Zellen zu analysieren, wurden die Zellen für fünf Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von T0901317 (LXR-Antagonist) inkubiert.

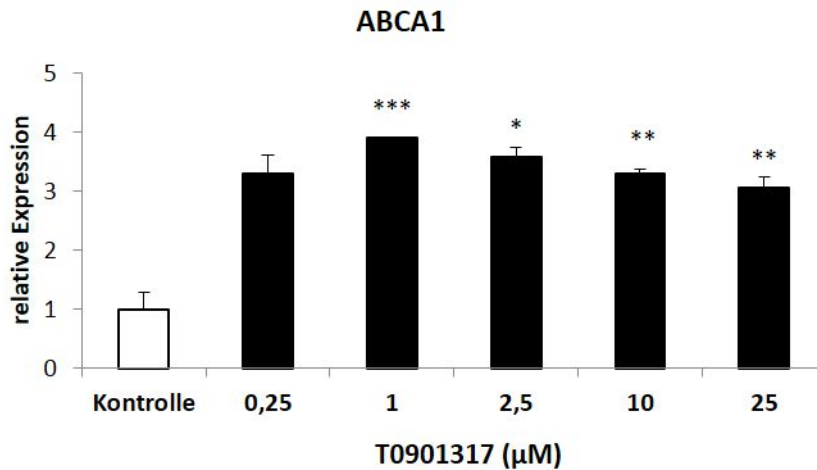


Abb. 2: Induktion von ABCA1 durch LXR-Agonisten in HepaRG-Zellen.

HepaRG-Zellen wurden 28 Tage differenziert und anschließend fünf Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen des LXR-Agonisten T0901317 inkubiert. Die Genexpression wurde mittels qPCR gemessen. (n = 4, Mittelwert ± SD). Die Daten aus zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt. Verglichen wird die Kontrolle mit unterschiedlichen Konzentrationen von T0901317 ($P \leq 0,05$: * $P \leq 0,01$: **, $P \leq 0,001$: ***)

Abb. 2 zeigt eine deutliche Induktion der ABCA1-mRNA-Genexpression durch eine Inkubation mit dem LXR-Agonisten. Bereits bei einer Konzentration von 0,25 µM T0901317 kam es zu einer Induktion der ABCA1-Expression, die allerdings nicht statistisch signifikant war. Höhere Konzentrationen führten zu einer signifikanten Induktion der Expression. Somit kann in den Experimenten von einer erfolgreichen LXR-Aktivierung durch T0901317 ausgegangen werden.

Um den Einfluss der LXR-Aktivierung auf pro-inflammatorische Gene in HepaRG zu untersuchen, wurden differenzierte HepaRG-Zellen zunächst eine Stunde mit unterschiedlichen Konzentrationen des LXR-Agonisten T0901317 vorinkubiert und im Anschluss vier Stunden mit TNF α stimuliert. Nach Ablauf der vier Stunden wurden die Überstände mittels ELISA und die Zellen mittels qPCR analysiert.

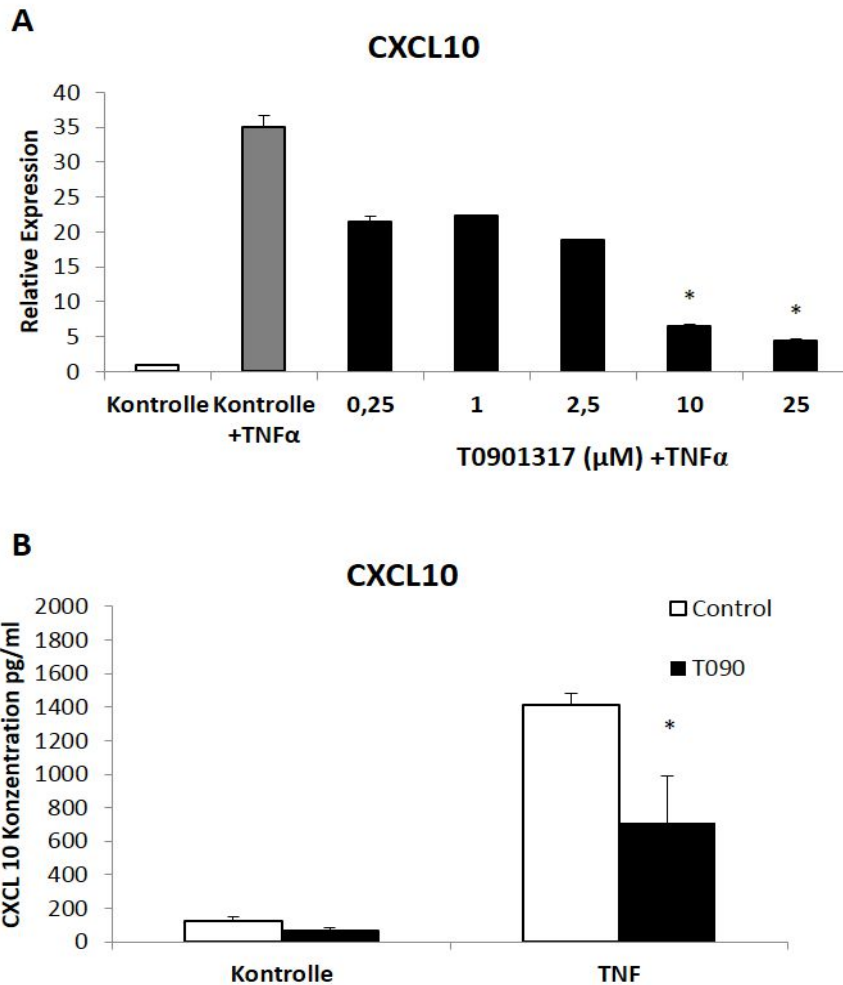


Abb. 3: Inhibition der CXCL10-Expression und -Sekretion nach Stimulation mit einem LXR-Agonist- und TNFα

28 Tage differenzierte HepaRG-Zellen wurden eine Stunde mit unterschiedlichen Konzentrationen von T0901317 inkubiert und anschließend für vier Stunden mit TNFα stimuliert. Die Genexpression von CXCL10 wurde mittels qPCR (A) und das CXCL10-Protein mittels ELISA (B) analysiert (n = 4, Mittelwert ± SD). Verglichen wird Kontrolle mit unterschiedlichen Konzentrationen von T0901317 und Kontrolle +TNFα mit unterschiedlichen Konzentrationen von T0901317 +TNFα. P ≤ 0,05; * P ≤ 0,01; ** P ≤ 0,001; ***)

Abb. 3 zeigt eine konzentrationsabhängige Inhibition der TNFα-induzierten CXCL10-Expression durch den LXR-Agonisten T0901317. Die inhibierende Wirkung erreichte ab Konzentrationen von 1 μM T0901317 statistische Signifikanz.

Die Ergebnisse der qPCR-Analyse wurden auf Proteinebene mittels ELISA bestätigt. Im Überstand der mit LXR-Agonisten (10μM) inkubierten Zellen war der CXCL10-Proteingehalt im Vergleich zu der Kontrolle signifikant reduziert.

Der Effekt des LXR-Agonisten T0901317 auf die TNF α -induzierte Genexpression wurde auch in primären Zellen analysiert. Dazu wurden, aus Mauslebern isolierte, primäre Hepatozyten verwendet.

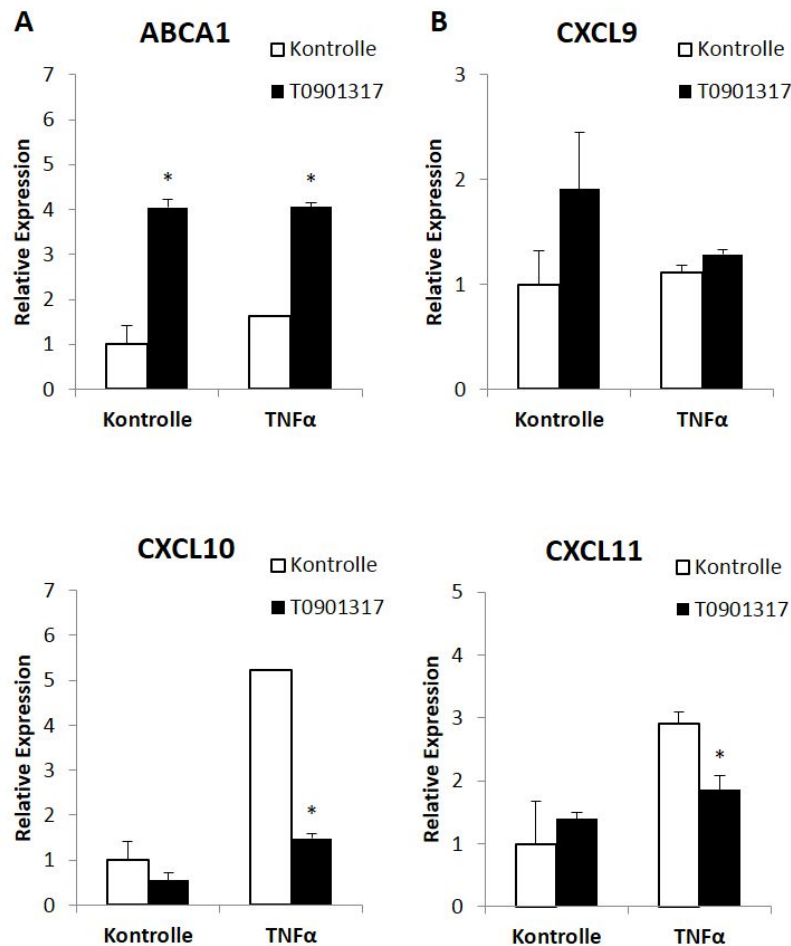


Abb. 4: Effekt des LXR-Agonist T0901317 auf die TNF α -regulierte Genexpression (ABCA1, CXCL9, CXCL10 und CXCL11) in primären murinen Hepatozyten

Aus Mausleber isolierte primäre Hepatozyten wurden eine Stunde mit 10 μ M T0901317 inkubiert und anschließend für vier Stunden mit TNF α stimuliert. Die Genexpression von ABCA1, CXCL9, CXCL10 und CXCL11 wurde mittels qPCR gemessen. Verglichen wird die Kontrolle +TNF α mit T0901317 +TNF α (n = 4, Mittelwert \pm SD. P \leq 0,05: * P \leq 0,01: **, P \leq 0,001: ***)

Auch in diesem Experiment mit primären murinen Hepatozyten [Abb. 4] zeigt sich eine deutliche, von einer zusätzlichen Behandlung mit TNF α unabhängige Induktion des LXR-Zielgens ABCA1 durch T0901317. Der genexpressionssteigernde Effekt von TNF α auf die CXCL10- und CXCL11-Gene wurde durch T0901317 gehemmt. Für CXCL9 konnte keine Induktion durch TNF α festgestellt werden.

Zusammenfassend konnte in den Zellkultur-Experimenten gezeigt werden, dass die LXR-Aktivierung durch den Agonisten T0901317 eine inhibitorische Wirkung auf die Genexpression und Proteinsekretion von CXCR3-Liganden in Hepatozyten unter proinflammatorischen Bedingungen (TNF α -Induktion) hat. Diese Wirkung konnte sowohl in einer humanen Hepatom-Zelllinie als auch in primären murinen Hepatozyten gezeigt werden.

3.2 Bedeutung der LXR Aktivierung für die Genexpression von CXCR3 Liganden in einer durch Concanavalin A induzierten akuten Leberentzündung

Für die Analyse des *in vivo* Effektes von LXR-Agonisten auf die entzündungsinduzierte CXCL10-Expression und hepatische T-Zell-Infiltration wurden zehn Wochen alte C57BI/6J Mäuse 32 Stunden und acht Stunden vor ConA-Injektion mit einer Konzentration von 50 mg/kg/d T0901317 per Gavage behandelt. Sechs Stunden nach ConA-Injektion wurden die Mäuse sakrifiziert und die Lebern mittels qPCR-TaqMan analysiert. Dabei wurde die Genexpression bekannter LXR-Zielgene quantifiziert.

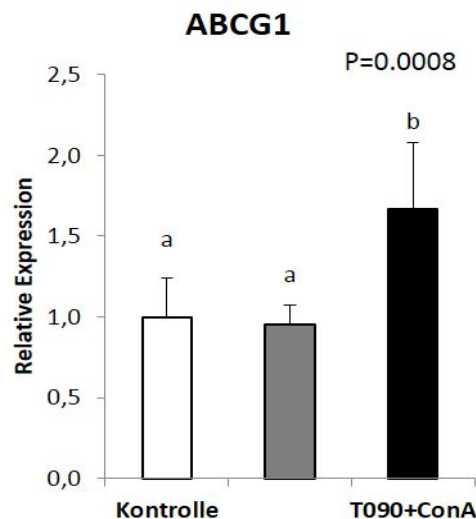


Abb. 5: Induktion des LXR-Zielgens ABCG1 durch den LXR Agonisten T0901317 im ConA-Modell

Mäuse wurden mit dem LXR-Agonisten T0901317 36 Stunden und acht Stunden vor ConA-Injektion per Gavage behandelt. Sechs Stunden nach ConA-Injektion wurden die Mäuse sakrifiziert. Danach wurde die mRNA isoliert und die Genexpression mittels qPCR gemessen (n = 6, Mittelwert \pm SD). Die Daten wurden mittels *one way* ANOVA statistisch untersucht, Gruppen mit identischen Buchstaben (*a, b, c*) unterscheiden sich nicht signifikant ($p \geq 0,05$)

Abb. 5 zeigt die Induktion der Genexpression von ABCG1 durch den LXR-Agonisten in dem *in vivo* Modell. Die ABCA1-Expression wird durch eine ConA-Inkubation nicht beeinflusst.

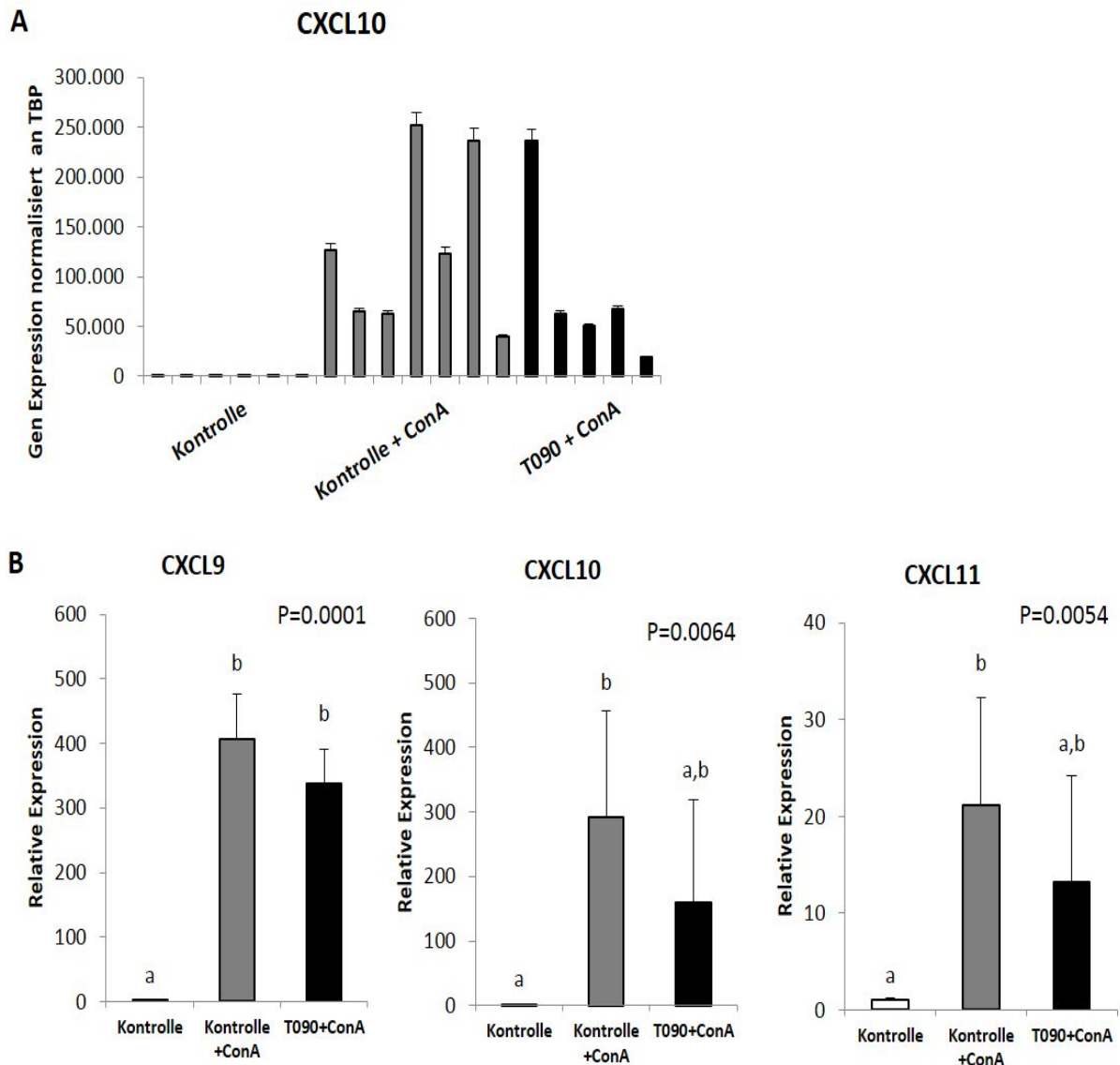


Abb. 6: Effekt des LXR-Agonisten T0901317 auf die Genexpression von CXCR3-Liganden im ConA Modell

Mäuse wurden mit dem LXR-Agonisten T0901317 zweimalig (36 Stunden und acht Stunden vor ConA-Injektion) per Gavage behandelt. Sechs Stunden nach ConA-Injektion wurden die Mäuse sakrifiziert. Danach wurde die mRNA isoliert und die Genexpression mittels qPCR gemessen A) Einzelwerte der gemessenen CXCL10-mRNA-Expression B) Mittelwerte der mRNA-Expression von CXCL9, CXCL10, CXCL11, (n ≥ 5 Mittelwert ± SD). Die Daten wurden mittels *one way* ANOVA statistisch untersucht, Gruppen mit identischen Buchstaben (a, b, c) unterscheiden sich nicht signifikant (p ≥ 0,05).

Die ConA-Injektion bewirkte eine massive Induktion der Genexpression der CXCR3-Liganden in den untersuchten Lebern. Diese Induktion war allerdings mit großen

Schwankungen verbunden [Abb. 6]. Durch eine zusätzliche Behandlung der Mäuse mit dem LXR-Agonisten konnte die mRNA-Expression der drei CXCR3-Liganden reduziert werden. Diese Senkung erreichte allerdings in keinem Fall eine statistische Signifikanz.

Auch die Messung des Serumspiegels des Leberenzym ALT ergab große Schwankungen innerhalb der Gruppen [Abb. 7]. Bei den mit ConA- und LXR-Agonisten behandelten Mäusen zeigte sich ein im Mittel verringerter Serumspiegel verglichen mit den ConA-behandelten Mäusen. Die Unterschiede zur Kontrollgruppe waren jedoch in beiden Gruppen nicht signifikant.

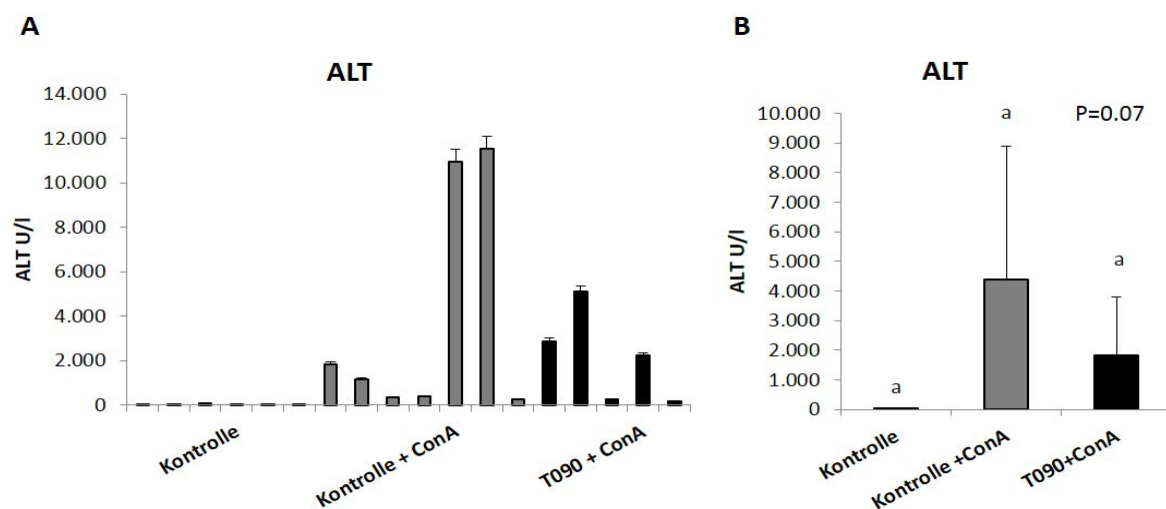


Abb. 7: Effekt des LXR-Agonisten T0901317 auf die Genexpression von Alanin-Aminotransferase (ALT) im ConA-Modell

Mäuse wurden mit dem LXR-Agonisten T0901317 36 Stunden und 8 Stunden vor ConA-Injektion per Gavage behandelt. Sechs Stunden nach ConA-Injektion wurden die Mäuse sakrifiziert und die Serumkonzentration der Alanin-Aminotransferase bestimmt A) Einzelwerte der gemessenen ALT-Konzentration im Serum B) Mittelwerte der gemessenen ALT-Konzentration, (n ≥ 5, Mittelwert ± SD). Die Daten wurden mittels *one way* ANOVA statistisch untersucht, Gruppen mit dem gleichen Buchstaben (*a*, *b*, *c*) unterscheiden sich nicht signifikant (p ≥ 0,05).

Eine FACS-Analyse der mit ConA-stimulierten Lebern ergab keine quantitativen Unterschiede des Anteils von CD25⁺-CD4⁺-FOXP3-Zellen an CD4⁺-T-Zellen mit und ohne LXR-Agonist-Behandlung [Abb. 8].

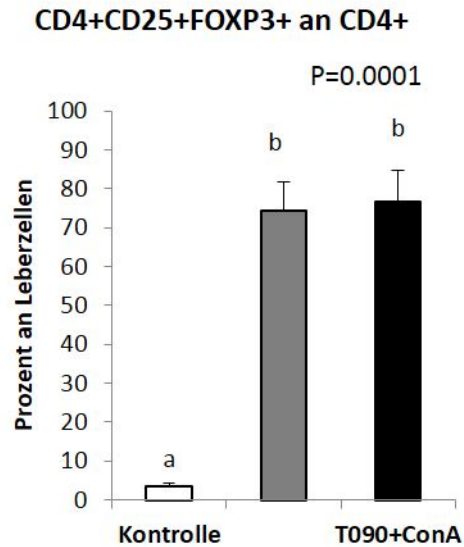


Abb. 8: Effekt des LXR-Agonisten T0901317 auf den Anteil von CD4⁺-CD25⁺-FOXP3-T-Zellen an CD3⁺-Zellen in der Leber im ConA-Modell

Mäuse wurden mit dem LXR-Agonisten T0901317 36 Stunden und 8 Stunden vor ConA-Injektion per Gavage behandelt. Sechs Stunden nach ConA-Injektion wurden die Mäuse sakrifiziert. Die Lebern wurden mittels FACS-Analyse untersucht (n ≥ 5, Mittelwert ± SD). Die Daten wurden mittels *one way* ANOVA statistisch untersucht, Gruppen mit dem gleichen Buchstaben (*a*, *b*, *c*) unterscheiden sich nicht signifikant (p ≥ 0,05).

Zusammenfassend zeigen die Experimente, dass die LXR-Aktivierung durch den Agonisten T0901317 zu einer Induktion bekannter LXR-Zielgene wie z.B. ABCG1 führt. Es konnte aber – vermutlich aufgrund der Streuung der Werte - innerhalb der Gruppen keine signifikante Inhibition der ConA-induzierten Expression der CXCR3-Liganden und des Leberenzym festgestellt werden. In den Genexpressionsanalysen von CXCL9, CXCL10 und CXCL11 und bei der Bestimmung des Leberenzym ALT ließ sich die Tendenz einer Inhibition erkennen, die aber statistisch keine Signifikanz erreichte. Weiter wurde die Infiltration der Lebern mit CD4⁺-CD25⁺-FOXP3-T-Zellen nach ConA-Stimulation durch den LXR-Agonisten nicht signifikant inhibiert.

3.3. LXR Aktivierung inhibiert die Genexpression proinflammatorischer Chemokine und die Rekrutierung von T Zellen in einem Mausmodell der chronischen Leberentzündung

Aufgrund der fehlenden Wirkung im ConA-Modell einer akuten Leberentzündung, stellte sich die Frage, ob die LXR-Aktivierung die Chemokin-Expression und die T-Zell-Rekrutierung bei einer chronischen Leberentzündung inhibieren kann. Als Modell für eine chronische Leberentzündung wurden transgene Mäuse mit einer leberspezifischen Überexpression von $\text{IFN}\gamma$ (SAP- $\text{IFN}\gamma$ -Modell) untersucht.

Nach einer Woche Fütterung mit dem LXR-Agonisten T0901317 wurden die SAP- $\text{IFN}\gamma$ -Mäuse sakrifiziert. Danach wurden die Lebern der Tiere analysiert. Zunächst wurde zur Kontrolle der LXR-Aktivierung die mRNA-Expression der bekannten LXR-Zielgene ABCG5 und FAS analysiert. Diese zeigte sich durch die T0901317-Fütterung stark erhöht [Abb. 9].

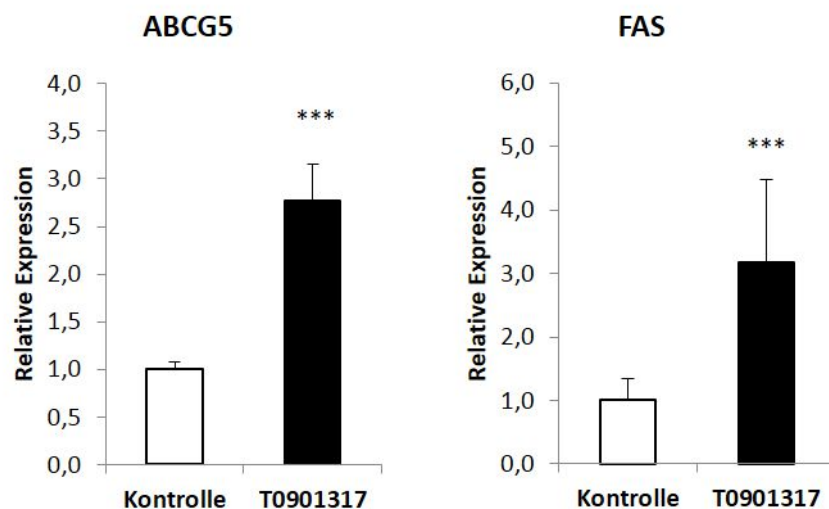


Abb. 9: Induktion der LXR-Zielgene ABCG5 und FAS durch den LXR Agonisten T0901317 im $\text{IFN}\gamma$ -Modell für chronische Leberentzündung.

$\text{IFN}\gamma$ -transgene Mäuse mit einer leberspezifischen $\text{IFN}\gamma$ -Expression wurden mit dem LXR-Agonisten T0901317 sieben Tage mit einer Konzentration von 50 mg/kg/d gefüttert. Nach sieben Tagen wurden die Mäuse sakrifiziert. Die mRNA wurde isoliert und die Genexpression von ABCG5 und FAS mittels qPCR gemessen. (n = 5, Mittelwert \pm SD; $P \leq 0,05$: * $P \leq 0,01$: **; $P \leq 0,001$: ***)

Auch in diesem Modell wurden die Leberenzyme ALT und AST als Maß für die Leberschädigung im Serum bestimmt. Abb. 10 zeigt eine deutlich erhöhte Sekretion in den mit LXR-Agonisten behandelten Mäusen. Zusätzlich kann man in der HE-Färbung eine beginnende Lipid-Akkumulation erkennen. Zudem war das Gewicht der Lebern zum Zeitpunkt der Organentnahme in den mit T0901317 gefütterten Mäusen signifikant erhöht.

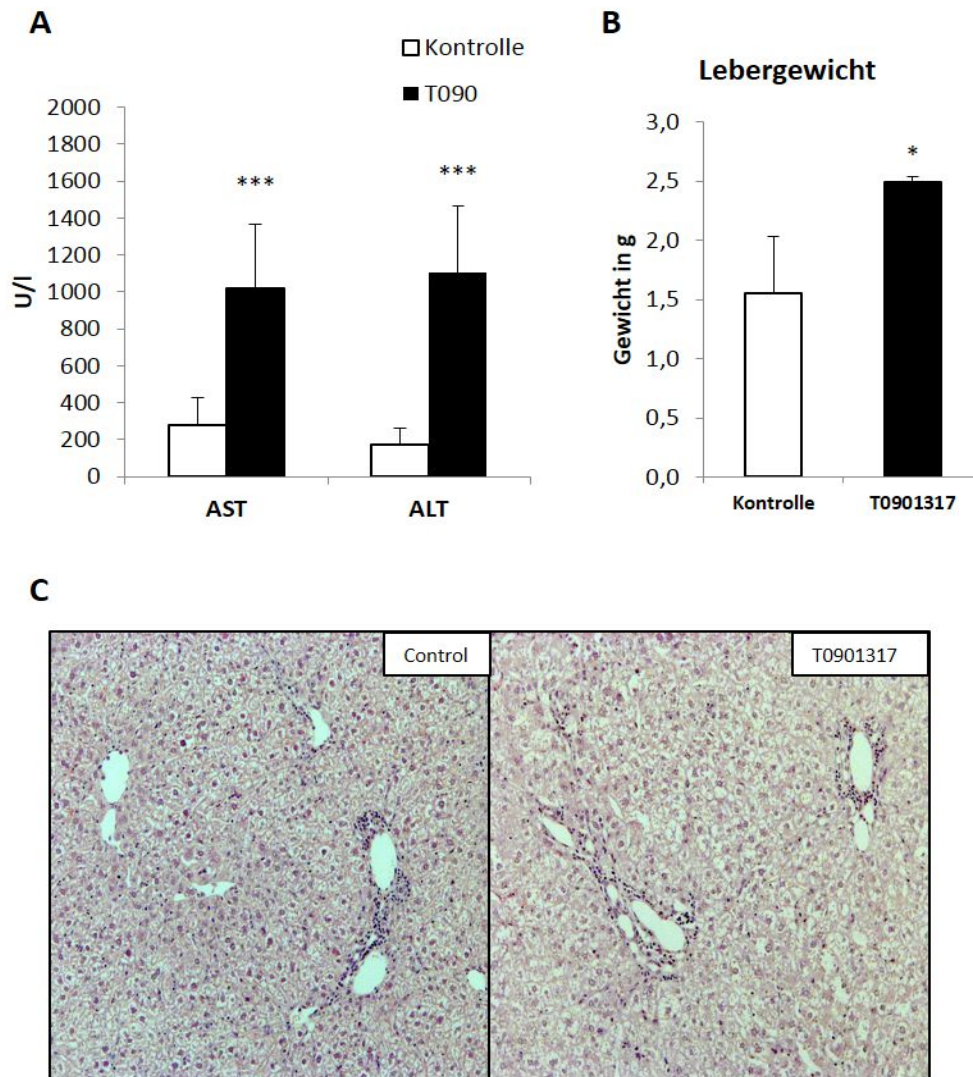


Abb. 10: Effekt des LXR-Agonisten T0901317 im IFN γ -Modell für chronische Leberentzündung auf die Leber-Transaminasen (ALT, AST), das Lebergewicht und die HE-Färbung der Leber IFN γ -transgene Mäuse mit einer leberspezifischen IFN γ -Expression wurden mit dem LXR-Agonisten T0901317 sieben Tage mit einer Konzentration von 50 mg/kg/d gefüttert. Nach sieben Tagen wurden die Mäuse sakrifiziert. Danach wurden die Lebertransaminasen gemessen (A) das Lebergewicht (B) bestimmt, und eine HE-Färbung (C) angefertigt. (n = 5, Mittelwert \pm SD, P \leq 0,05: * P \leq 0,01: **, P \leq 0,001: ***)

Die Bestimmung der CXCL9-, CXCL10- und CXCL11-mRNA-Expression ergab eine signifikante Inhibition der Expression aller drei CXCR3-Liganden durch die T0901317-Fütterung [Abb. 11]. Eine LXR-Aktivierung kann daher die Genexpression proinflammatorischer Chemokine hemmen. Die Expression von CD4, ein Marker für Th1-Zellen, wurde ebenfalls signifikant reduziert. Dies lässt eine reduzierte Anzahl an rekrutierten Th1-Zellen in der Leber vermuten.

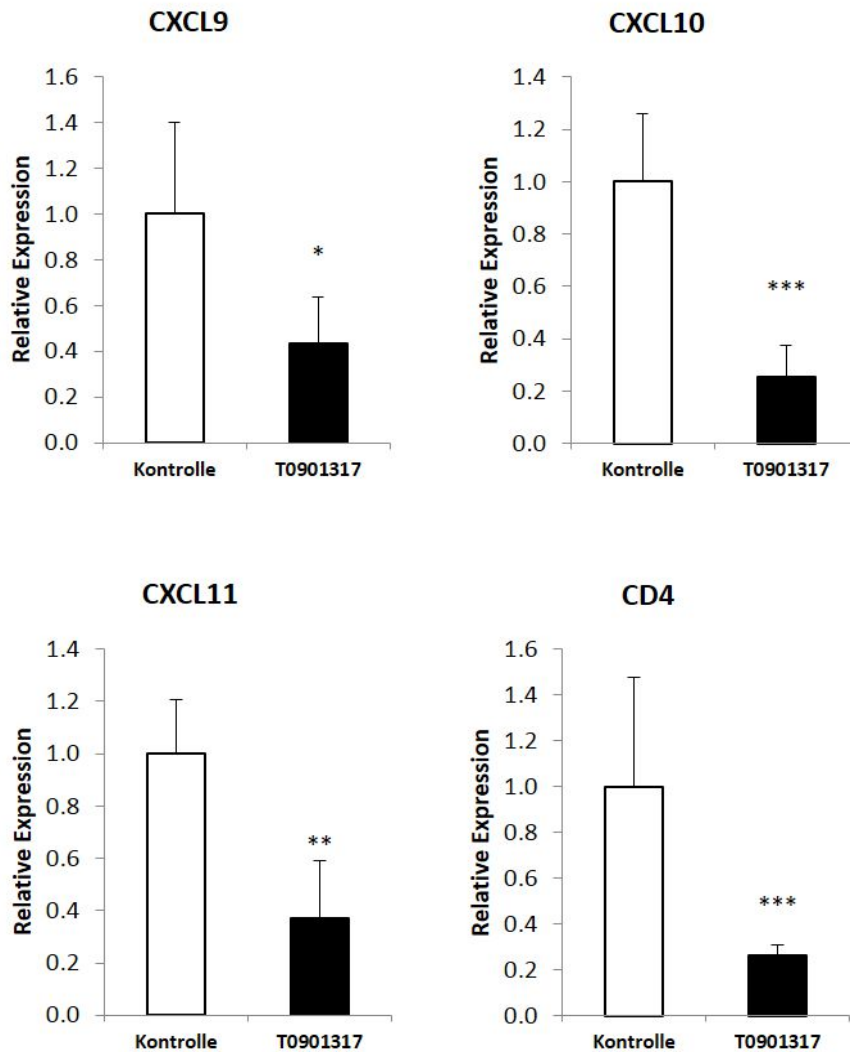


Abb. 11: Effekt des LXR-Agonisten T0901317 im IFN γ -Modell für chronische Leberentzündung auf die Expression von CXCR3-Liganden und CD4

IFN γ -transgene Mäuse mit einer leberspezifischen IFN γ -Expression wurden mit dem LXR-Agonisten T0901317 sieben Tage mit einer Konzentration von 50 mg/kg/d gefüttert. Nach sieben Tagen wurden die Mäuse sakrifiziert. Danach wurde die mRNA isoliert und die Genexpression von CXCL9, CXCL10, CXCL11 und CD4 mittels qPCR gemessen. (n = 5, Mittelwert \pm SD, $P \leq 0,05$: *, $P \leq 0,01$: **, $P \leq 0,001$: ***)

Um die Infiltration von T-Zellen genauer zu untersuchen, wurde eine immunhistochemische Färbung von CD3⁺-Zellen durchgeführt [Abb. 12].

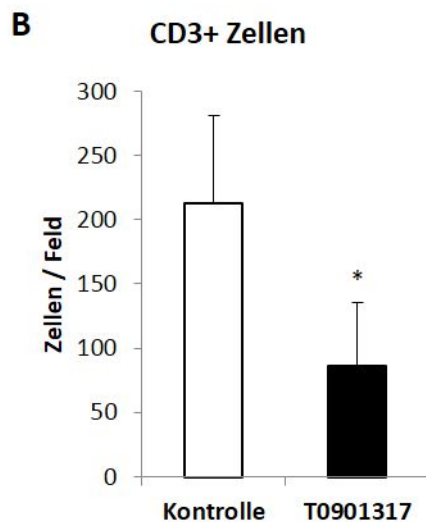
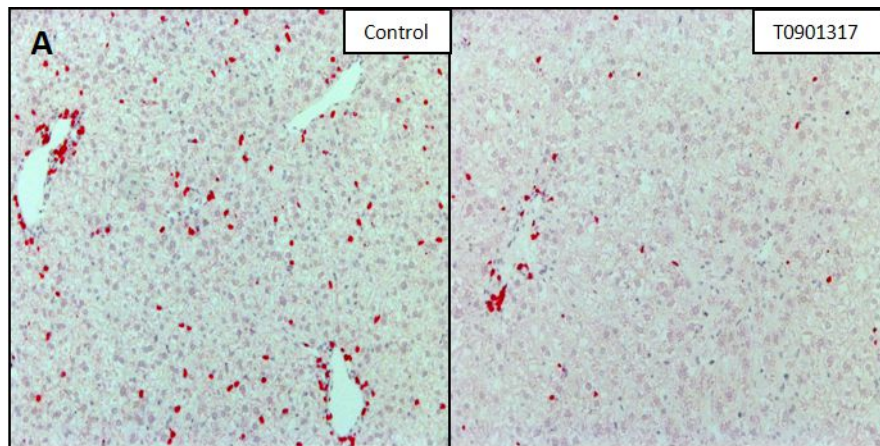


Abb. 12: Effekt des LXR-Agonisten T0901317 im IFN γ -Modell für chronische Leberentzündung auf die Anzahl CD3⁺-Zellen in der Leber

IFN γ -transgene Mäuse mit einer leberspezifischen IFN γ -Expression wurden mit dem LXR-Agonisten T0901317 sieben Tage mit einer Konzentration von 50 mg/kg/d gefüttert. Nach sieben Tagen wurden die Mäuse sakrifiziert. Danach wurde eine immunhistochemische Färbung (A) von CD3⁺-Zellen in der Leber angefertigt. B) Auszählung der CD3⁺-Zellen von fünf repräsentativen Schnitte von je fünf Mäusen. (n = 5, Mittelwert \pm SD, P \leq 0,05: * P \leq 0,01: **, P \leq 0,001: ***)

Wie in Abb. 12 zu erkennen, führte eine T0901317-Fütterung zu einer deutlichen Reduktion der CD3⁺-T-Zellen in der Leber. Um die Infiltration von CD3⁺-T-Zellen zu quantifizieren, wurden jeweils fünf histologische Schnitte beider Gruppen ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Es zeigte sich eine signifikant reduzierte Anzahl an CD3⁺-Zellen in der mit LXR-

Agonisten behandelten Gruppe. Eine genaue FACS-Analyse konnte aufgrund der Leberverfettung nicht durchgeführt werden.

Die Ergebnisse dieses Experiments lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: Die LXR-Aktivierung durch einen spezifischen Agonisten kann *in vivo* in einem Modell der chronischen Leberentzündung die Genexpression pro-inflammatorischer Chemokine hemmen. Zudem wird die Rekrutierung von T-Zellen in die Leber verringert. Gleichzeitig führt die Fütterung mit dem LXR-Agonisten T0901317 zu einem erhöhten Lebergewicht, einer beginnenden Verfettung und zu erhöhten Spiegel von Lebertransaminasen.

4. Diskussion

4.1 Mechanismen der anti- inflammatorischen Wirkung von LXR

In dieser Arbeit sollte die Rolle des Lipid-aktivierbaren Transkriptionsfaktors LXR für Entzündungsprozesse in der Leber untersucht werden. Die durchgeführten Zellkulturexperimente belegen, dass eine LXR-Aktivierung die Genexpression und Proteinsekretion pro-inflammatorischer Chemokine in Hepatozyten hemmen kann. Vor allem die TNF α -induzierte Synthese des CXCR3-Liganden CXCL10 wurde sowohl in HepaRG als auch in primären murinen Hepatozyten durch eine LXR-Aktivierung effektiv inhibiert. Wie in der Einleitung beschrieben, zeigen viele Studien eine anti-inflammatorische Wirkung von LXR [49-53]. Bisher konnte gezeigt werden, dass LXR-Agonisten in Makrophagen, Endothelzellen und in Astrozyten [59] die Genexpression pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine hemmen. Für diese anti-inflammatorische Wirkung sind unterschiedliche Mechanismen beschrieben. Zunächst wurde eine antagonisierende Wirkung auf den pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktor NF κ B identifiziert. Da NF κ B keine direkten Bindungsstellen für LXR besitzt, wurde eine Interaktion mit weiteren Kofaktoren vermutet [49]. Der in der Folge entdeckte Mechanismus der Transrepression konnte diese Vermutung bestätigen. Liganden-abhängig findet eine Bindung von SUMO-2/3 (SUMOlierung) an LXR statt. Für die SUMOlierung von LXR ist die Ligase HDAC4 (histone deacetylase 4) notwendig. Nach der Bindung von SUMO-2/3 können die Repressoren NCoR und SMRT an den Komplex binden [51]. Durch die Loslösung dieser Repressoren von NF κ B oder AP1 kann die NF κ B- oder AP1-abhängige Aktivierung von pro-inflammatorischen Genen erfolgen [60]. Einige Gene werden entweder über NCoR oder SMRT reguliert, während bei anderen beiden Repressoren entfernt werden müssen [61]. 2011 konnte in einer Studie gezeigt werden, dass CORO2A (Coronin actin binding protein 2A) ein Teil des NCoR-Komplexes ist und eine Bindestelle für SUMO-2/3 enthält [62]. Auch bei der LPS-abhängigen Aktivierung des CXCL10-Gens spielen CORO2A und NCoR eine wichtige Rolle. Zum Mechanismus der Inhibition pro-inflammatorischer Gene durch LXR-Aktivierung in Hepatozyten liegen nur vereinzelt Daten vor. Blaschke et al. konnten zeigen, dass eine LXR-Aktivierung die Expression des C-reaktiven Proteins nach IL-1 β - und IL-6 Stimulation in Hepatozyten hemmen kann. Da diese Wirkung ebenfalls von NCoR abhängig ist [63], findet der Mechanismus der Transrepression vermutlich auch in Hepatozyten statt. LXR spielt bei der Regulation der Akuten-Phase-Reaktion der Leber eine Rolle [64] und inhibiert die

Genexpression von Haptoglobin und Serum Amyloid A (SAA). In dieser Studie wurde auch eine SUMOlierung von LXR und eine anschließende Bindung an NCoR beschrieben. Interessanterweise wurde die anti-inflammatorische Wirkung vor allem LXR β zugeschrieben.

Um den Mechanismus der Inhibition der Expression der CXCR3-Liganden in Hepatozyten aufzuklären, wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, Chromatin-Immunpräzipitationen durchzuführen. Dabei sollte analysiert werden, ob eine potenzielle Bindung von NCoR an das CXCL10-Gen durch LPS gelöst wird und ob eine LXR-Aktivierung diese Loslösung von NCoR vom CXCL10-Gen verhindern kann. Leider konnten diese Experimente im Rahmen dieser Arbeit methodisch nicht umgesetzt werden. Um den exakten Mechanismus der Inhibition pro-inflammatorischer Gene durch LXR-Aktivierung in Hepatozyten zu klären, sind weitere Studien erforderlich. Dennoch deuten die Ergebnisse und die in der Literatur beschriebenen Daten auf einen über NCoR-vermittelten transrepressiven Mechanismus hin.

4.2 CXCR3 Liganden und die Rekrutierung von T Zellen zur Leber

In einem Tiermodell für die chronische Leberentzündung (SAP-IFN γ -Maus) führte eine Behandlung mit LXR-Agonisten zu einer reduzierten Infiltration von CD3⁺-T-Zellen in die Leber. Daraus ergibt sich die Frage, ob dieser LXR-Effekt mit der reduzierten Genexpression von CXCR3-Liganden in Zusammenhang steht. Das Wissen über die Bedeutung der CXCR3-Liganden bei chronischen Lebererkrankungen konnten in den letzten Jahren ausgebaut werden. Narumi et al. berichteten 1997 erstmals über eine erhöhte Expression von CXCL10 bei Patienten mit chronischer Hepatitis C [65]. 1999 wurde dann die Bedeutung von CXCR3-Liganden für die selektive Rekrutierung von T-Effektor-Zellen entdeckt [66]. Der Schweregrad der Leberentzündung bei Hepatitis C korreliert mit der CXCL10-Expression [67]. Rekrutierte T-Zellen bei der chronischen Hepatitis C zeigen dabei eine hohe Expression des CXCR3-Rezeptors. Bei einer chronischen Hepatitis C kommt es auch zu einer erhöhten Expression von CXCL9 und CXCL11, die mit dem Schweregrad der Leberschädigung und der Fibrosierung korreliert [68]. Eine erhöhte Expression von CXCR3-Liganden konnte darüber hinaus bei autoimmunvermittelten Erkrankungen festgestellt werden. Patienten mit Autoimmunhepatitis und primärer biliärer Zirrhose zeigen signifikant erhöhte Serumspiegel von CXCL10 [69]. Bei der primären biliären Zirrhose konnten zudem erhöhte Spiegel in den Lebersinusoiden und eine erhöhte Frequenz an CXCR3-positiven Zellen in der Leber

detektiert werden [70]. Somit gibt es zahlreiche Belege für die Rolle von CXCR3-Liganden in der Pathogenese von chronischen Lebererkrankungen.

Die Bedeutung von den CXCR3-Liganden bei der Rekrutierung von T-Zellen wurde in einer Reihe von experimentellen Studien in unterschiedlichen Mausmodellen bestätigt. Mäuse mit einer Überexpression des Hepatitis C Virus-(HCV)-Kernproteins zeigen eine starke Infiltration von CD4⁺-CXCR3⁺-T-Zellen in die Leber, die durch eine Blockade des CXCR3-Rezeptors verhindert wird [71]. Interessanterweise führt die Überexpression des HCV-Kernproteins zu einer Aktivierung von NFκB, mit dem Effekt einer gesteigerten Genexpression der CXCR3-Liganden. Obwohl CXCL9, CXCL10 und CXCL11 allesamt an CXCR3 binden, konnten verschiedene Studien auch Organ-spezifische und kinetische Unterschiede feststellen. In einem Pankreatitis-Modell vermittelte CXCL10 selektiv die Rekrutierung von T-Zellen zum Pankreas, CXCL9 zeigte keinen Effekt [72]. Dagegen war in einem Nephritis-Modell vorwiegend CXCL9 an der T-Zell-vermittelten Schädigung der Niere beteiligt, während CXCL10 keinen Effekt hatte [73]. In der Leber deuten die Daten auf ein komplexes Zusammenspiel der CXCR3-Liganden hin. In einem Modell für eine ischämische Leberschädigung wurde gezeigt, dass ausschließlich die Expression von CXCL10 (und nicht CXCL9 und CXCL11) massiv induziert wird und dass eine Blockade von CXCL10 einen stark protektiven Effekt hat [74]. In einem Modell für Autoimmunhepatitis wurde dagegen von Makrophagen synthetisiertes CXCL9 als entscheidender Mediator für die T-Zell Infiltration identifiziert. Eine Blockade von CXCL9 zeigte in dem Modell einen protektiven Effekt auf die Leberschädigung [75]. Wie in einem weiteren Mausmodell gezeigt, sind bei einer Cytomegalie-Virus-Infektion CXCL10 und CXCL9 essentiell für die Rekrutierung von Antigen-spezifischen T-Lymphozyten [76]. Eine Blockade der CXCR3-Liganden führte in diesem Modell zu einer persistierenden Infektion und in Folge zu einer verstärkten Leberschädigung. Kürzlich wurden weitere Studien zu bisher unbekannt Funktionen von CXCR3-Liganden veröffentlicht. In diesen Untersuchungen vermittelten die CXCR3-Liganden nicht nur die Rekrutierung von T-Zellen in die Leber, sondern auch die transendotheliale Migration von T-Zellen in das Leberparenchym [25]. Die Befunde unterstreichen die Relevanz der CXCR3-Liganden bei chronischen Lebererkrankungen, bei denen es zu einer Infiltration von T-Zellen in das Leberparenchym kommt. 2012 wurde die Bedeutung der CXCR3-Liganden bei der Rekrutierung von Th17-Zellen entdeckt. Durchflusszytometrische Untersuchungen ergaben, dass die Rekrutierung von Th17-Zellen zwar durch alle drei Liganden gesteuert werden kann, CXCL10 aber eine dominante Rolle

einnimmt. Die Positionierung der Th17-Zellen in den Gallengängen wird durch CCL20, ebenfalls ein Chemokin, gesteuert [77]. Eine erhöhte Infiltration von Th17-Zellen ist für eine Vielzahl chronischer Lebererkrankungen beschrieben. Interessanterweise sind CXCR3-Liganden auch an der Rekrutierung von T_{reg} beteiligt [28]. Bei CXCR3-defizienten Mäusen ist die Toleranzentwicklung in der Leber aufgrund einer deutlich verminderten Anzahl von rekrutierten T_{reg} gestört. T_{reg} sezernieren anti-inflammatorische Zytokine, die eine Immunantwort abschwächen. Ein gestörtes Gleichgewicht von T_{reg} und T-Effektorzellen gilt als Ursache für autoimmunvermittelte Leberentzündungen [22,23]. Somit kommt den CXCR3-Liganden in diesem Kontext eine protektive Funktion zu, das Fehlen des CXCR3-Rezeptors führt zum Verlust der Immuntoleranz. In einem Mausmodell der Atherosklerose führt eine CXCL10-Blockade zu einer verminderten Anzahl an rekrutierten T-Zellen, aber zu einem Anstieg von T_{reg} [78]. Um die Rolle der CXCR3-Liganden im feinregulierten Gleichgewicht von T_{reg} und T-Effektorzellen zu charakterisieren, werden weitere Studien notwendig sein, um die gezielte Modulation als therapeutische Option in verschiedenen Krankheitsmodellen zu validieren.

Auch bei dem in der vorliegenden Studie verwendeten Modell der ConA-vermittelten akuten Leberentzündung wird eine wichtige Rolle für die CXCR3-Liganden (besonders CXCL10) beschrieben [28, 79]. Andere Zytokine wie RANTES (Regulated on activation, normal T Cell expressed and secreted), MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein 1) und MIP-1 α (Macrophage inflammatory protein 1 alpha) zeigen dagegen keinen Effekt. Nach einer ConA-Injektion kommt es zu einer massiven Freisetzung der CXCR3-Liganden, gefolgt von einer T-Zell-Infiltration. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob über eine LXR-vermittelte Reduktion der Expression von CXCR3-Liganden im ConA Modell die Infiltration von T-Zellen verhindern kann. Die Ergebnisse der Expressionsanalysen für die CXCR3-Liganden [Abb. 6] zeigten lediglich einen Trend in Richtung einer verminderten Expression der CXCR3-Liganden, eine statistisch signifikante Inhibition konnte nicht detektiert werden. Eine mögliche Erklärung für diese Befunde ist, dass der Entzündungsreiz in diesem Modell durch weitere Faktoren vermittelt wird, die einen möglichen inhibitorischen Effekt der LXR-Aktivierung überdecken. Auch die Kontrollgruppe zeigte eine große Schwankung in der Genexpression der CXCR3-Liganden und in dem Ausmaß der Leberschädigung [Abb. 6 und Abb. 7]. Bei dem in der vorliegenden Studie benutzten zweiten Mausmodell für eine chronische Leberentzündung (SAP-IFN γ -Maus) wurden bisher keine Daten zur Rolle der CXCR3-Liganden veröffentlicht. In den Analysen der Lebern zeigte sich in den vorliegenden

Experimenten eine Expression aller drei Liganden [Abb.11], welche durch LXR Aktivierung stark inhibiert wurden. Zugleich ist eine deutlich reduzierte Anzahl an CD3⁺ T Zellen zu beobachten. Es kann somit auch in diesem Modell von einer hohen Relevanz der CXCR3 Liganden für die Rekrutierung von T Zellen ausgegangen werden.

4.3 Die Rolle von LXR bei der Rekrutierung von T Zellen zur Leber

Die inhibitorische Wirkung der LXR-Aktivierung auf die T-Zell-Rekrutierung wirft die Frage auf, durch welche Zellen dieser Effekt vermittelt wird. Wie bereits diskutiert, kann von einer wichtigen Rolle der CXCR3-Liganden ausgegangen werden. Die Zellkultur-Experimente mit HepaRG-Zellen und primären Hepatozyten in der vorliegenden Studie zeigten eine starke Expression von CXCL10 nach TNF α -Stimulation [Abb. 3 und Abb. 4]. Die expressionssteigernde Wirkung von IFN γ und TNF α auf die Gene der Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 ist bekannt [80]. IFN γ und TNF α können in der Leber von aktivierten Makrophagen, Kupffer-Zellen und CD4⁺-T-Zellen produziert werden. Die CXCR3-Liganden wiederum können von einer Vielzahl an hepatischen Zellen, wie Hepatozyten, Ito-Zellen, Kupffer-Zellen, LSEC und T-Zellen sezerniert werden. Harvey et al. beschrieben Hepatozyten als vermutliche Hauptquelle von CXCR3-Liganden [30]; dennoch ist bekannt, dass auch Kupffer-Zellen und T-Zellen an der Produktion beteiligt sind. Curbishleys et al. klärten einen Mechanismus auf, bei dem aktivierte T-Zellen durch die Sekretion von CXCR3-Liganden die Rekrutierung weiterer T-Zellen bewirken [25].

Die anti-inflammatorische Wirkung von LXR auf Immunzellen ist umfangreich untersucht. In Kupffer-Zellen kann eine LXR-Aktivierung die LPS-induzierte TNF α -Produktion hemmen. LXR-defiziente Kupffer-Zellen zeigen eine erhöhte Expression von TNF α nach LPS-Stimulation [81]. Daher könnte die verminderte CXCR3-Liganden-Expression in den Lebern der SAP-IFN γ -Mäuse nach Gabe des LXR-Agonisten auch auf eine inhibitorische Wirkung auf die TNF α -Sekretion in Kupffer-Zellen zurückzuführen sein. Weiter konnte gezeigt werden, dass die LXR-Aktivierung in CD4⁺-T-Zellen die Expression von IFN γ inhibiert [82]. Auch diese immunmodulierende Wirkung von LXR könnte über eine Reduktion der IFN γ -Sekretion zur verringerten Sekretion der CXCR3-Liganden-Expression nach Stimulation mit LXR-Agonisten in den Lebern der SAP-IFN γ -Mäuse beigetragen haben. Darüber hinaus inhibiert LXR die Expression der Interleukine IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23R, welche die

Proliferation von Th17-Zellen stimulieren [83]. Zum Wirkungsspektrum von LXR gehört weiter eine Inhibition der Th1- und Th2-Zellproliferation [84]. Die zahlreichen beschriebenen immunregulativen Effekte von LXR lassen überlappende Wirkungen auf die T-Zellrekrutierung und Infiltration vermuten und können auch in den vorliegenden Versuchen eine Rolle gespielt haben. Zum einen können LXR-Agonisten über eine Senkung der Produktion von TNF α in Kupffer-Zellen und IFN γ in T-Zellen die Genexpression von CXCR3-Liganden in Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen inhibieren, was wiederum den chemotaktischen Reiz für die Infiltration von T-Zellen vermindert. Gleichzeitig ist aber auch eine direkte Wirkung der LXR-Aktivierung in Hepatozyten anzunehmen, bei der über den Mechanismus der Transrepression eine Inhibition der Expression der CXCR3-Liganden erfolgt. Zudem könnte die inhibierende Wirkung auf die T-Zell-Proliferation die Anzahl an infiltrierenden T-Zellen reduzieren. Um die Frage nach der dominierenden Ursache für die beobachtete verringerte T-Zellinfiltration zu klären, sind weitere Studien nötig. Hierfür müsste beispielsweise gezielt eine Ausschaltung der TNF α -Produktion durch Kupffer-Zellen oder IFN γ -Produktion durch T-Zellen erfolgen. Dennoch konnte im Rahmen dieser Studie eine eindeutige Inhibition der Expression der CXCR3-Liganden nach LXR-Aktivierung in Hepatozyten und in *in vivo* Modellen festgestellt werden. Diese Befunde belegen, dass Hepatozyten eine wichtige Rolle bei der Kontrolle immunologischer Vorgänge in der Leber übernehmen.

4.4 Möglichkeiten der therapeutischen Anwendung von LXR Agonisten

Obwohl die Anzahl an infiltrierenden T-Zellen in den Lebern der mit LXR-Agonisten behandelten Mäusen drastisch reduziert war, zeigten sich bei den Leberenzymen deutlich erhöhte Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe [Abb. 10] Zusätzlich war in der Histologie auch eine beginnende Verfettung der Leberzellen zu erkennen. Diese Effekte einer LXR-Agonisten-Gabe sind in der Literatur gut beschrieben [44, 85] und beruhen auf einer Induktion der Lipogenese. In den durchgeführten Messungen konnte eine starke Induktion der FAS-Expression, welches als Schlüsselenzym der Lipogenese bekannt ist [44], detektiert werden [Abb. 9]. Die gesteigerte Lipogenese führt zur Entwicklung einer Steatose und zu einer stärkeren Leberschädigung, die auch im Anstieg der Lebertransaminasen erkennbar ist. Allerdings wird diese LXR-Wirkung vor allem auf die Aktivierung von LXR α zurückgeführt [86]. Eine große Anzahl von Studien beschreiben sowohl LXR α als auch LXR β als

regulatorische Transkriptionsfaktoren für inflammatorische Prozesse [59, 87]. Analysen mit LXR α - und LXR β -defizienten Mäuse belegen aber, dass nur LXR β die Synthese der Akute Phase Proteine in der Leber beeinflusst, LXR α zeigt keinen Effekt [64]. Damit übernimmt auch LXR β , trotz seiner niedrigeren Expression in Hepatozyten, eine wichtige Rolle in der Regulation immunologischer Vorgänge in der Leber. Auch wenn im Rahmen dieser Studie keine Differenzierung zwischen LXR α - und LXR β -Effekten vorgenommen werden konnte, ist davon auszugehen, dass LXR β an der Inhibition der Expression der CXCR3-Liganden beteiligt war. Dies ist vor dem Hintergrund interessant, dass zuletzt vielversprechende Fortschritte in der Entwicklung neuer LXR β -spezifischer Agonisten gemacht wurden. Ein spezifischer LXR β -Agonist, der zu keiner Induktion von SREBP1c führt, wurde erstmals 2008 [88] beschrieben. Andere neue LXR β -spezifische Agonisten führen in Mausmodellen nicht zum Auftreten einer Steatose [89, 90]. Einige dieser neuen LXR-Agonisten wurden zuletzt in klinische Testphasen aufgenommen [91]. Sollte sich die ausbleibende Induktion der Lipogenese bestätigen, könnten diese Agonisten eine neue Therapieoption bei chronisch entzündlichen Lebererkrankungen darstellen. Eine Vielzahl dieser Erkrankungen ist durch eine Infiltration von T-Zellen gekennzeichnet. Bei der akuten Hepatitis B und C ist diese Infiltration von T-Zellen Bestandteil der spezifischen Immunantwort gegen das Virus. In chronischen Stadien kommt es zu einer unspezifischen Akkumulation von Th1-Zellen, die für die Progression zur Fibrosierung und letztlich zur Leberzirrhose verantwortlich ist [1, 2]. In diesen Stadien könnten LXR-Agonisten die Expression T-Zell-rekrutierender Chemokine inhibieren, die T-Zell-Akkumulation verhindern und damit den chronischen Entzündungsprozess abschwächen. Auch für die Autoimmunhepatitis und die primäre biliäre Zirrhose sind eine massive Akkumulation von T-Zellen und erhöhte Werte für CXCR3-Liganden beschrieben [29, 69]. Bei diesen Erkrankungen könnte eine LXR-Aktivierung ebenfalls zu einer verminderten Rekrutierung von T-Zellen führen und den Entzündungsprozess möglicherweise abschwächen. Für den klinischen Einsatz von LXR-Agonisten sind allerdings weitere Studien nötig, um die spezifische Wirkung der LXR α - und LXR β -Aktivierung auf unterschiedliche Zellpopulationen zu klären. Dennoch kann ausgehend von dieser Studie eine inhibierende Wirkung der LXR-Aktivierung auf die Infiltration von T-Zellen angenommen werden. Der in der vorliegenden Studie beschriebene, die T-Zell-Infiltration hemmende Effekt lässt einen therapeutischen Nutzen von LXR-Agonisten bei chronischen Leberentzündungen vermuten. In Zukunft könnten daher LXR-Agonisten eine neue medikamentöse Option im Rahmen der Therapie dieser Erkrankungen darstellen.

5. Zusammenfassung

Metabolisch-, viral- und autoimmun-bedingte chronische Lebererkrankungen führen zur Infiltration von T-Zellen. Entscheidend für die Rekrutierung von T-Zellen in die Leber sind Chemokine, die über spezifische Rezeptoren an die T-Zellen binden, und so chemotaktisch wirken können. Im Rahmen dieser Studie sollte der Einfluss des Lipid-aktivierbaren Transkriptionsfaktors LXR (Liver-X-Receptor) auf die Expression pro-inflammatorischer Chemokine und auf die Rekrutierung von T-Zellen in die Leber untersucht werden.

Die durchgeführten Zellkulturexperimente belegen, dass der LXR-Agonist T0901317 konzentrationsabhängig die Genexpression des CXCR3-Liganden CXCL10 in der humanen Zelllinie HeparG und in primären murinen Hepatozyten hemmen kann. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde in zwei Mausmodellen die Wirkung einer LXR-Aktivierung auf die Expression der CXCR3-Liganden und die Rekrutierung von T-Zellen untersucht. In dem Modell einer akuten Leberentzündung (Concanavalin A-induzierte Entzündung) konnten bei Gabe von T0901317 keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression der CXCR3-Liganden und der Aktivierung von T-Zellen im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. Bei dem Modell für eine chronische Leberentzündung (SAP (Serum Amyloid A)-IFN γ (Interferon-gamma)-Mausmodell) konnte *in vivo* gezeigt werden, dass die LXR-Aktivierung sowohl die Genexpression der CXCR3-Liganden hemmen als auch die Infiltration CD3⁺-Zellen in der Leber reduzieren kann. Allerdings kam es auch zu einem Anstieg der Lebertransaminasen und zu Anzeichen für eine beginnende Verfettung. Das Wissen um die immunmodulierende Funktion der LXR in der Leber konnte durch die vorliegenden Untersuchungen erweitert werden. Für einen potentiellen therapeutischen Einsatz von LXR-Agonisten bei chronischen Entzündungen sind noch weitere Analysen erforderlich.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind kürzlich zur Publikation in einer internationalen Fachzeitschrift eingereicht worden.

6. Summary

This study included *in vitro* and *in vivo* experiments to investigate the role of LXR activation for the recruitment of T cells. Gene expression of the chemokine CXCL10 was significantly inhibited by LXR activation both in human HepaRG hepatoma cells and primary murine hepatocytes. LXR activation could not reduce chemokine expression and T cell activation in a strong model of acute hepatitis. However, SAP IFN γ transgenic mice with chronic hepatitis, showed decreased expression of chemokines and markedly reduced infiltration of CD3⁺ T cells after LXR agonist treatment for one week. In summary, this study shows that LXR activation can potentially inhibit the expression of T cell attracting chemokines, thereby reducing the infiltration of T cells.

7. Abkürzungsverzeichnis

ABCA1	ATP-Binding Cassette Transporter member 1
ABCG1	ATP-Binding Cassette Subfamily G 1
ABCG5	ATP-Binding Cassette Subfamily G 5
ABCG8	ATP-Binding Cassette Subfamily G 8
AP1	Activator Protein 1
ApoA1	Apolipoprotein A-1
ApoE	Apolipoprotein E
ARL7	ADP-ribosylation factor (ARF) like 7
CD4	Cluster of Differentiation
Con A	Concanavalin A
CORO2A	Coronin Actin Binding Protein 2A
COX-2	Cyclooxygenase-2
CXCR3	Chemokine (C-X-C motif) receptor 3
CYP1A2	Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2
CYP2B6	Cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 6
CYP7A1	Cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1
CYXP3A4	Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4
FAS	Fatty Acid Synthase
Foxp3	Forkhead Box P3
GLUT4	Glucose Transporter Type 4
HDAC4	Histone Deacetylase 4
HDL	High-density Lipoprotein
HSP	Heat Shock Protein
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
iNOS	Nitric Oxide Synthase 2, inducible
LDL	Low Density Lipoprotein
LPL	Lipoproteinlipase
LPS	Lipopolysaccharid
LXR	Liver X Receptor
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-2
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIP-1 α	Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha
NCoR	Nuclear Receptor Corepressor 1
NF κ B	Nuclear factor-kappaB

NOD	Nucleotide-Binding Oligomerization Domain
PAMP	Pathogen-associated Molecular Patterns
PPAR α	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha
PRR	Pattern-Recognition Receptors
PXR	Pregnane X Receptor
RXR	Retinoid X Receptor
SAA	Serum Amyloid A
SCD1	Stearoyl-CoA desaturase-1
SMRT	Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid Hormone Receptors
SREBP1c	Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1
TBL1	Transducin (beta)-like 1
TGF β	Transforming Growth Factor Beta
TLR	Toll-like Receptor
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha

8. Literaturverzeichnis

- 1 Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet* 2008; 371: 838-51
- 2 Sun B, Karin M. Obesity, Inflammation, and liver cancer. *Journal of Hepatology* 2011; 56(3):704-13
- 3 Ishibashi H, Nakamura M, Komori A, Migita K, Simoda S. Liver architecture, cell function, and disease. *Semin Immunopathol* 2009 31:399-409
- 4 Racanelli V, Rehermann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology* 2006, 43:S54—S62
- 5 Meylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 2006 442:39-44
- 6 Tacke F, Luedde T, Trautwein C. Inflammatory pathways in liver homeostasis and liver injury. *Clin Rev Allergy Immunol* 2009; 36:4-12
- 7 Schwabe RF, Seki E, Brenner DA. Toll-like receptor signaling in the liver. *Gastroenterology* 2006; 130:1886-1900
- 8 Ye H, Adams D. The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver. *Journal of Autoimmunity* 2010; 45-54
- 9 Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune response. *Annual Review of Immunology* 2004. 22. 531-562
- 10 Seki E, Brenner DA. Toll-like receptor signaling in the liver. *Gastroenterology* 2006; 130:322-335
- 11 Bieghs V, Trautwein C. Innate immune signaling and gut-liver interactions in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2014
- 12 Janeway CA, Sharrow So, Simpson E. T-cell populations with different functions. *Nature* 1975; 13:253(5492):544-6
- 13 Finberg R, Benacerraf B. Induction, control and consequences of virus specific cytotoxic T cells. *Immunol Rev.* 1981; 58:157-80
- 14 Jung MC, Diepolder HM, Pape GR. T cell recognition of hepatitis B and C viral antigens. *Eur J Clin Invest* 1994. 24(10):641-50

- 15 Mosmann TR, Cherwinski, Bond MW. Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology*. 1986, 136;2348-2357
- 16 Schroder K, Hertzog P, Ravasi T, Hume D. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions, *Journal of Leukocyte Biology* 2004. 75(2):163-89
- 17 Noelle RJ, Roy M, Shepherd DM, Stamenkovic I, Ledbetter Ja, Aruffo A. A novel ligand on activated T helper cells binds CD40 and transduces the signal for the cognate activation. *Proc Natl Acad Sci* 1989. 6550
- 18 Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004. 21(4) 467-476
- 19 Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nature Immunol* 2007;8:345-50
- 20 Zhao L, Tang Y, You Z. Interleukin-17 contributes to the pathogenesis of autoimmune hepatitis through inducing hepatic interleukin-6 expression. *PLoS One* 2011. Vol 6(4)
- 21 Chen W, Jin W, Hardegen N. et al. Conversion of peripheral CD4+CD25-naïve T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *Journal of Experimental Medicine* 2003. Vol.198, nko.12. 1875-1886
- 22 Longhi MS, Ma Y, Bogdanos DP, Cheeseman P, Vergani D. Impairment of CD4+CD25+ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2004, Vol. 41 31-37
- 23 Abe M, Hiasa Y, Onji M. T helper 17 cells in autoimmune liver diseases. *Clin Dev Immunol*. 2013. 2013:607073
- 24 Charo I, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokines receptors in inflammation. 2006; *N. Engl. J. Med.* 354 610-621
- 25 Curbishleys SM, Eksteen B, Gladue RP, Lalor P, Adams DH. CXCR3 activation promotes lymphocyte transendothelial migration across human hepatic endothelium under Fluid flow. *Am J Pathol*. 2005, 167:887
- 26 Cruise MW, Lukens JR, Nguyen AP, Lassen MG, Waggoner SN, Hahn YS. Fas ligand is responsible for CXCR3 chemokine induction in CD4+ T cell dependent liver damage. *J Immunol* 2006

- 27 Dumoulin FL, Bach A, Leifeld L, et al. Semi-quantitative analysis of intrahepatic cytokines mRNA in chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 1997; 175:681-685
- 28 Erhardt A, Wegscheid C, Claass B, Carambia A, Herkel J, Mittrücker HW, Panzer U, Tiegs G. CXCR3 deficiency exacerbates liver disease and abrogates tolerance in a mouse model of immune-mediated hepatitis. *J Immunol* 2011. 1;186(9)
- 29 Chuang Y, Lian Z, Cheng C, Lan R, Gershwin M. et al. Increased levels of chemokine receptor CXCR3 and chemokines IP-10 and MIG in patients with primary biliary chirrhosis and their first degree relatives. *Journal of Autoimmunity* 2005, 126-132
- 30 Harvey CE, Post JJ, Palladinetti P, Freeman AJ, Ffrench RA, Kumar RK, Marinos G, Lloyd AR. Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation. *J Leukoc Biol.* 2003; 74(3):360-9.
- 31 Ellmann S, Sticht H, Thiel F, Beckmann MW, Strick R, Strissel PL. Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. *Cell Mol Life Sci.* 2009. 66(15):2405-26
- 32 Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature.* 1996. 383(6602):728-31.
- 33 Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA et al. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha und LXRbeta. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96:266-71
- 34 Repa JJ, Mangelsdorf DJ. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; 16:459-81
- 35 Mitro N, Vargas L, Romeo R, Koder A, Saez E. T0901317 is a potent PXR ligand. Implications for the biology ascribed to LXR. *FEBS Lett* 2007, 581:1721
- 36 Houck KA, Borchert KM, Hepler CD et al. T0901317 is a dual LXR/FXR agonist. *Mol Gent Metab* 2004. 83:184-7
- 37 Repa J. et al. Regulation of absorption and ABCA1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 2000. 289. 1524-1529

- 38 Zelcer N, Tontonoz P. Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *J Clin Invest* 2006 116:607-14
- 39 Venkateswaran A, et al. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR α . *Proc Natl Acad Science* 2000. 97; 12097-12102
- 40 Naik S, et al. Pharmacological activation of liver X receptor promotes reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation* 2006. 113;90-97
- 41 Brooks-Wilson A. et al. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nature Genetics* 1999. 22; 336-345
- 42 Joseph SB, Tontonoz P, et al. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Science* 2002. 99(11): 7604-9
- 43 Brunsham LR, et al. Tissue-specific induction of intestinal ABCA1 expression with a liver X receptor agonist raises plasma HDL cholesterol levels. *Circ. Res.* 2006. 99 672-674
- 44 Chen G, Liang G, Ou J, Goldstein JL & Brown MS. Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc. Natl. Acad. Science* 2004. 101; 11245-11250
- 45 Peet DJ, et al. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR α . *Cell* 1998. 93: 693-704
- 46 Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, Schwendner S, Wang S, Thoolen M, Mangelsdorf DJ, Lustig KD, Shan B. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* 2000; 14(22):2831-8.
- 47 Van der Veen JN, et al. Activation of liver X receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol. *J Biol. Chem* 2009. 284 19211-19219
- 48 Calkin A, Tontonoz P. Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nature Reviews Mol Cell Biol* 2012. 13(4):213-24
- 49 Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nature Med* 2003. 9:213-19

- 50 Pascual G, Fong A, Ogawa S, Gamliel A, Li A, Glass C, et al. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR γ . *Nature* 2006. Sep 29;437(7059):759-63
- 51 Ghisletti S, Huang W, Ogawa S, Pascual G, Lin ME, Willson TM, Rosenfeld MG, Glass CK. Parallel SUMOylation- dependent pathways mediate gene- and signal- specific transrepression by LXRs and PPAR γ . *Mol Cell* 2007; 12;25(1):57-70.
- 52 Hindinger C, Hinton DR, Kirwin SJ, Atkinson RD, Burnett ME, Stohlman SA. Liver X receptor activation decreases the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 2006. 84(6): 1225-34
- 53 Fowler AJ, Sheu MY, Schmuth M, Kao J, Fluhr JW, Rhein L, et al. Liver X receptor activators display anti-inflammatory activity in irritant and allergic contact dermatitis models: liver-X-receptor-specific inhibition of inflammation and primary cytokine production. *J Invest Dermatol.* 2003. 120(2): 246-55
- 54 Guillouzo A, Corlu A, Aninat C, Glaise D, Morel F, Guguen-Guillouzo C. The human hepatoma HepaRG cells: A highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chemico-Biological Interactions* 2007. 168 66-73
- 55 Tiegs G, Hentschel A, Wendel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *Journal Clin Invest.* 1992. 90 196-203
- 56 Erhardt A, Wegscheid C, Claass B, Carambia A, Herkel J, Mittrücker HW, Panzer U, Tiegs G. CXCR3 deficiency exacerbates liver disease and abrogates tolerance in a mouse model of immune-mediated hepatitis. *J Immunol.* 2011. 186(9):5284-93
- 57 Okamoto T, Yamamura K, Hino O. The mouse interferon-gamma transgene chronic hepatitis model. *Int J Mol Med.* 1999. 3(5):517-20.
- 58 Sul HS, Wang D. Nutritional and hormonal regulation of enzymes in fat synthesis: studies of fatty acid synthase and mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase gene transcription. *Annu Rev Nutr.* 1998. 18:331-51.
- 59 Lee JH, Park SM, Kim OS, Le CS, Woo JH, Park SJ, Joe EH. Differential SUMOylation of STAT1 Inflammatory Signaling in IFN γ -Stimulated Brain Astrocytes. *Molecular Cell* 2009. 35(6):806-17
- 60 Ogawa S, Lozach J, Jepsen K, Sawka-Verhelle D, Perissi V, Sasik R, Rose DW, Johnson RS, Rosenfeld MG, Glass CK. A nuclear receptor corepressor transcriptional checkpoint controlling activator protein 1-dependent gene

- networks required for macrophage activation. *Proc Natl Acad Sci* 2004. 101(40):14461-6
- 61 Ghisletti S, Huang W, Jepsen K. Cooperative NCoR/SMRT interactions establish a corepressor-based strategy for integration of inflammatory and anti-inflammatory signaling pathways. *Genes Dev.* 2009. 23:681-693
- 62 Huang W, Ghisletti S, Saijo K, Gandhi M, Aouadi M, Tesz GJ, Zhang DX, Yao J, Czech MP, Goode BL, Rosenfeld MG, Glass CK. Coronin 2A mediates actin-dependent de-repression of inflammatory response genes. *Nature* 2011. 470(7334):414-8
- 63 Blaschke F, Takata Y, Caglayan E, Collins A, Tontonoz P, Hseuh WA, Tangirala RK. A nuclear receptor corepressor-dependent pathway mediates suppression of cytokine-induced C-reactive protein gene expression by liver X receptor. *Circ Res* . 2006; 99(12):e88-99
- 64 Venteclef N, Jakobsson T, Ehrlund A, Damdimopoulos A, Mikkonen L, Ellis E, Nilsson LM, Parini P, Jänne OA, Gustafsson JA, Steffensen KR, Treuter E. GPS2-dependent corepressor/SUMO pathways govern anti-inflammatory actions of LRH-1 and LXRbeta in the hepatic acute phase response. *Genes Dev.* 2010; 24(4):381-95
- 65 Narumi S, Tominga Y, Tamaru M, Shimai S, Okumura H, Nishioji K, Itoh Y, Okanoue T. Expression of IFN-inducible protein-10 in chronic hepatitis. *J Immunol.* 1997. 158(11):5536-44.
- 66 Shields PL, Morland CM, Salmon M, Qin S, Hubscher SG, Adams DH. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *J Immunol.* 1999. 163(11):6236-43.
- 67 Harvey CE, Post JJ, Palladinetti P, Freeman AJ, French RA, Kumar RK, Marinos G, Lyoyd AR. Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation. *J Leukoc Biol.* 2003. 74(3):360-9.
- 68 Zeremski M, Petrovic L, Chiriboga L, Brown Q, Yee H, Kinkhabwala M, et al. Intrahepatic Levels of CXCR3-Associated Chemokines Correlate With Liver Inflammation and Fibrosis in Chronic Hepatitis C. *Hepatology* 2008. 48(5):1440-50
- 69 Nishioji K, Okanoue T, Itoh Y, Narumi S, Sakamoto M, Nakamura H, Morita A, Kashima K. Increase of chemokine interferon-inducible protein-10 (IP-10)

- in the serum of patients with autoimmune liver diseases and increase of its mRNA expression in hepatocytes. *Clin Exp Immunol*. 2001. 123(2):271-9.
- 70 Chuang YH, Lian ZX, Cheng CM, lan RY, Yang GX, Moritoki Y, Chiang BL, et al. Increased levels of chemokine receptor CXCR3 and chemokines IP-10 and MIG in patients with primary biliary cirrhosis and their first degree relatives. *J Autoimmun*. 2005. 25(2):126-32
- 71 Zhou Y, Wang S, Ma JW, Lei Z, Zhu HF, Lei P, Yang ZS, et al. Hepatitis B Virus Protein X-induced Expression of the CXC Chemokine IP-10 is Mediated through Activation of Nf-kB and Increases Migration of Leukocytes. *J Biol Chem*. 2010. 285(16):12159-68
- 72 Christen U, McGavern DB, Luster AD, von Herrath MG, Oldstone MB. Among CXCR3 chemokines, IFN-gamma-inducible protein of 10 kDa (CXC chemokine ligand (CXCL) 10) but not monokine induced by IFN-gamma (CXCL9) imprints a pattern for the subsequent development of autoimmune disease. *J Immunol*. 2003. 171(12):6838-45.
- 73 Menke J, Zeller GC, Kikawada E, Menas TK, Huang XR, Lan HY, Lu B, Farber J, Luster AD, Kelley YR. CXCL9, but not CXCL10, promotes CXCR3-dependent immune-mediated kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2008 (6):1177-89
- 74 Zhai Y, Shen XD, Gao F, Zhao A, Freitas MC, Lassmann C, Luster AD et al. CXCL10 regulates Liver Innate Immune Response Against Ischemia and Reperfusion Injury. *Hepatology*. 2008. 47(1):207-14.
- 75 Ikeda A, Aoki N, Kido M, Iwamoto S, Nishiura H, Maruoka R, Chiba T, Watanabe N. Progression of Autoimmune Hepatitis is Mediated by IL-18-Producing Dendritic Cells and Hepatic CXCL9 Expression in Mice. *Hepatology*. 2014. 60(1):224-36
- 76 Hokeness KL, Deweerd ES, Munks MW, Lewis CA, Gladue RP, Salazar-Mather TP. CXCR3-dependent recruitment of antigen-specific T lymphocytes to the liver during murine cytomegalovirus infection. *J Virol*. 2007. 81(3):1241-50
- 77 Oo YH, Banz V, Kavanagh D, Liaskou E, Withers DR, Humphreys E, Reynolds GM, Lee-Turner L, Kalia N, Hubscher SG, Klenerman P, Eksteen B, Adams DH. CXCR3 dependent recruitment and CCR6 mediated positioning of Th-17 cells in the inflamed liver. *Journal of Hepatology* 2012;

- 78 Heller EA, Liu E, Tager AM, Yuan Q, Lin AY et al. Chemokine CXCL10 promotes atherogenesis by modulating the local balance of effector and regulatory T cells. *Circulation*. 2006. 113(19):2301-1
- 79 Tamaru M, Nishioji K, Kobayashi Y, Watanabe Y, Itoh Y, Okanoue T, Murai M, Matsushima K, Narumi S. Liver-infiltrating T lymphocytes are attracted selectively by IFN-inducible protein-10. *Cytokine*. 2000. 12(4):299-308.
- 80 Ohmori Y, Hamilton TA. The interferon-stimulated response element and a kappa B site mediate synergistic induction of murine IP-10 gene transcription by IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol*. 1995. 154(10):5235-44.
- 81 Wang YY, Dahle MK, Steffensen KR, Reinholt FP, Collins JL, Thiemermann C, et al. Liver X receptor agonist GW3965 dose-dependently regulates lps-mediated liver injury and modulates posttranscriptional TNF-alpha production and p38 mitogen-activated protein kinase activation in liver macrophages. *Shock* 2009 Nov;32(5):548-53
- 82 Walcher D, Kümmel A, Hehrle B, Back H, Grüb M, Durst R, Hombach V, Marx N. LXR activation reduces proinflammatory cytokine expression in human CD4-positive lymphocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26(5):1022-8
- 83 Xu, J, Wagoner G, Douglas J.C, Drew P. Liver X receptor agonist regulation of Th17 lymphocyte function in autoimmunity. *Journal of Leukocyte Biology*. 2009. 86(2):401-9
- 84 Solt LA, Kamenecka TM, Burris TP. LXR-mediated inhibition of CD4+ T helper cells. *PLoS One*. 2012. 7(9):e46615
- 85 Grefhorst A, Elzinga BM, Voshol PJ, Plösch T, Kok T, Bloks VW, van der Sluijs FH, Havekes LM, Romijn JA, Verkade HJ, Kuipers F. Stimulation of lipogenesis by pharmacological activation of the liver X receptor leads to production of large, triglyceride-rich very low density lipoprotein particles. *J Biol Chem*, 2002; 277(37):34182-90
- 86 Yu H, Wu J, Yang M, Gou J, Zheng L, Peng M, Zhang Q, Xiang Y, Cao J, Shen W. Involvement of liver X receptor alpha in histone modifications across the target fatty acid synthase gene. *Lipids*. 2012. 47(3):249-57
- 87 Hong C, Tontonoz P. Coordination of inflammation and metabolism by PPAR and LXR nuclear receptors. *Curr Opin Genet Dev*. 2008; 18(5):461-7.
- 88 Chao EY, Caravella JA, Watson MA, Campobasso N, Ghisletti S, Billin AN, Galardi C, Wang P, Laffitte BA, Lannone MA, Goodwin BJ, Nichols

- JA, Parks DJ, Stewart E, Wiethe RW, Williams SP, Smallwood A, Pearce KH, Glass CK, Willson TM, Zuercher WJ, Collins JL . Structure-guided design of N-phenyl tertiary amines as transrepression-selective liver X receptor modulators with anti-inflammatory activity. *J Med Chem.* 2008; 51(18):5758-65.
- 89 Kratzer A, Buchebner M, Pfeifer T, Becker TM, Uray G, Miyazaki M, Miyazaki-Anzai S, Ebner B, Chandak PG, Kadam RS, Calayir E, Rathke N, Ahammer H, Radovic B, Trauner M, Hoefler G, Kompella UB, Fauler G, Levi M, Levak-Frank S, Kostner GM, Kratky D.. Synthetic LXR agonist attenuate plaque formation in apoE $-/-$ mice without inducing liver steatosis and hypertriglyceridemia. *J Lipid Res.* 2009; 312-26
- 90 Peng D, Hiipakka RA, Xie JT, Dai Q, Kokontis JM, Reardon CA, Getz GS, Liao S. A novel potent synthetic steroidal liver X receptor agonist lowers plasma cholesterol and triglycerides and reduces atherosclerosis in LDLR($-/-$) mice. *Br J Pharmacol.* 2011; 1792-804
- 91 Hong C, Tontonoz P. Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery. *Nature reviews Drug Discovery* 2014. 13(6):433-4

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei **Prof Dr. Jörg Heeren** für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, für die Vergabe dieses spannenden Themas und für die hervorragende Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für die angenehme Arbeitsatmosphäre und fachliche Hilfe, insbesondere **Sandra Ehret, Birgit Henkel und Walter Tauscher** für die Einarbeitung im Labor und die großartige Unterstützung bei den Experimenten.

Bei meinen naturwissenschaftlichen Doktorandenkollegen **Leah Eissing, Alexander Bartelt, Karoline Brügelmann, Britta Hoffzimmer und Brigitte Müller** möchte ich mich für den guten wissenschaftlichen Austausch und für viele lustige Momente bedanken.

Den Kooperationspartnern dieser Arbeit **Dorothee Schwinge, Anette Erhardt, Prof. Dr. Christoph Schramm und Prof. Dr. Gisa Tiegs** danke ich für die konstruktive Zusammenarbeit.

Weiterhin möchte ich mich beim Graduiertenkolleg „Entzündung und Regeneration“ des „SFB 841 Leberentzündung“ für die finanzielle Unterstützung und die Erweiterung des wissenschaftlichen Horizonts bedanken.

Zuletzt danke ich meiner **Familie** für ihre tolle Unterstützung während des Studiums.

10. Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

11. Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Versicherung

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

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

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

Tobias Schmidt