

**„Die Rolle des Chemokinrezeptors CXCR3 im  
Rahmen der akuten und chronischen  
Leberschädigung“**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH  
Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der  
Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von  
Diplom-Biologe

Mirko Moreno Zaldivar

aus Pasewalk

Berichter: Professor Dr. med. Hermann E. Wasmuth  
Professor Dipl. Ing. Dr. Werner Baumgartner

Tag der mündlichen Prüfung: 25.09.2012

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

## Tabellarischer Lebenslauf

### Persönliche Daten

|                      |                 |
|----------------------|-----------------|
| Name :               | Moreno Zaldivar |
| Vorname :            | Mirko           |
| Geburtstag:          | 19.05.1980      |
| Geburtsort:          | Pasewalk        |
| Staatsangehörigkeit: | Deutsch         |

### Qualifikationen

Abitur 1998 am Humboldt Gymnasium Ebersbach  
Von 2000 -2006 Biologiestudium an der Goethe Univerität Frankfurt a.M.  
Abschluss: 2006 Diplom  
Beginn der Promotion: 2006

„Ein Wissenschaftler ist eine Mimose, wenn er selbst einen Fehler gemacht hat, und ein brüllender Löwe, wenn er bei anderen einen Fehler entdeckt.“

Albert Einstein

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt vorveröffentlicht:

**The chemokine receptor CXCR3 limits injury after acute toxic liver damage**

Zaldivar MM, Berres ML, Nellen A, Schmitz P, Gassler N, Streetz KL, Trautwein C, Wasmuth HE.

Lab Invest. 2012 May;92(5):724-34. doi: 10.1038/labinvest.2012.48. Epub 2012 Mar 19.

**Antifibrotic effects of CXCL9 and its receptor CXCR3 in livers of mice and humans.**

Wasmuth HE, Lammert F, Zaldivar MM, Weiskirchen R, Hellerbrand C, Scholten D, Berres ML, Zimmermann H, Streetz KL, Tacke F, Hillebrandt S, Schmitz P, Keppeler H, Berg T, Dahl E, Gassler N, Friedman SL, Trautwein C.

Gastroenterology. 2009 Jul;137(1):309-19, 319.e1-3. Epub 2009 Apr 1.

**CXC chemokine ligand 4 (Cxcl4) is a platelet-derived mediator of experimental liver fibrosis.**

Zaldivar MM, Pauels K, von Hundelshausen P, Berres ML, Schmitz P, Bornemann J, Kowalska MA, Gassler N, Streetz KL, Weiskirchen R, Trautwein C, Weber C, Wasmuth HE.

Hepatology. 2010 Apr;51(4):1345-53.

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Zusammenfassung</b> .....                                    | <b>7</b>  |
| <b>1 Einleitung</b> .....                                       | <b>9</b>  |
| 1.1 <i>Das Immunsystem</i> .....                                | 10        |
| 1.1.1 Kupfferzellen .....                                       | 11        |
| 1.1.2 neutrophile Granulozyten .....                            | 11        |
| 1.1.3 NK- Zellen .....  | 12        |
| 1.1.4 T- Zellen .....   | 13        |
| 1.1.5 Thrombozyten .....  | 14        |
| 1.2 <i>Zytokine und Chemokine</i> .....                         | 15        |
| 1.2.1 Der Chemokinrezeptor CXCR3 .....                          | 17        |
| 1.2.2 Liganden des Chemokinrezeptors CXCR3 .....                | 18        |
| 1.3 <i>Bisherige Forschungsergebnisse</i> .....                 | 19        |
| 1.4 <i>Zielsetzung</i> .....                                    | 23        |
| <b>2 Material und Methoden</b> .....                            | <b>24</b> |
| 2.1 <i>Liste der verwendeten Materialien</i> .....              | 24        |
| 2.1.1 Liste der verwendeten Laborgeräte .....                   | 24        |
| 2.1.2 Liste der verwendeten Gebrauchsmaterialien .....          | 25        |
| 2.1.3 Liste der verwendeten Chemikalien .....                   | 25        |
| 2.1.4 Liste der verwendeten Antikörper, Sonden und Primer ..... | 27        |
| 2.1.5 Liste der verwendeten Primer .....                        | 28        |
| 2.1.6 Liste der verwendeten Lösungen und Puffer .....           | 29        |
| 2.1.7 Liste der verwendeten Kits .....                          | 29        |
| 2.2 <i>Methoden</i> .....                                       | 30        |
| 2.2.1 Tierversuche .....  | 30        |
| 2.2.2 FACS Analyse .....  | 31        |
| 2.2.3 Intrazelluläre FACS Analyse .....                         | 32        |
| 2.2.4 RNS Isolation .....                                       | 33        |
| 2.2.5 Umschreiben der RNS in cDNS .....                         | 33        |
| 2.2.6 Gen Expressionsanalyse .....                              | 34        |
| 2.2.7 Protein Isolation .....                                   | 35        |
| 2.2.8 ELISA .....   | 35        |
| 2.2.9 Western Blot .....  | 36        |
| 2.2.10 TUNEL-Färbung .....                                      | 37        |
| 2.2.11 Immunofloureszenzfärbung der Ly6G positiven Zellen ..... | 38        |
| 2.2.12 H&E Färbung .....  | 38        |
| 2.2.13 Naphtol-AS-D-Chloracetatesterase-Färbung .....           | 39        |
| 2.2.14 Sirius-Rot Färbung .....                                 | 39        |
| 2.2.15 Messung des Hydroxyprolinegehaltes .....                 | 40        |
| 2.2.16 Zellkultur .....   | 40        |
| 2.2.17 Ermittlung der Migration .....                           | 41        |
| 2.2.18 Statistik .....  | 41        |
| 2.2.19 Kooperationen .....                                      | 42        |
| <b>3 Ergebnisse</b> .....                                       | <b>43</b> |
| 3.1 <i>Akute Leberschädigung</i> .....                          | 43        |
| 3.1.1 Ermittlung des Leberschadens .....                        | 43        |
| 3.1.2 Durchflusszytometrische Analyse .....                     | 45        |
| 3.1.3 Alternative Wege der NK-Zellrekrutierung .....            | 47        |
| 3.1.4 Das Fehlen von NK-Zellen verstärkt den Leberschaden ..... | 52        |
| 3.1.5 Neutrophile Granulozyten vermitteln Leberschaden .....    | 55        |
| 3.1.6 Mechanismus der Neutrophilenrekrutierung .....            | 59        |
| 3.2 <i>Chronische Leberschädigung</i> .....                     | 63        |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 3.2.1    | CXCR3 <i>knockout</i> Tiere entwickeln eine starke Fibrose .....  | 63         |
| 3.2.2    | Expression der CXCR3 Liganden.....                                | 68         |
| 3.2.3    | Humane Daten .....  | 70         |
| 3.2.4    | CXCL9 hat antifibrotische Effekte <i>in vitro</i> .....           | 72         |
| 3.3      | Das Chemokin CXCL4 .....  | 74         |
| 3.3.1    | Humane Daten .....  | 74         |
| 3.3.2    | CXCL4 induziert Migration und Proliferation <i>in vitro</i> ..... | 78         |
| <b>4</b> | <b>Diskussion .....</b>   | <b>83</b>  |
| 4.1      | Akute Leberschädigung .....                                       | 83         |
| 4.2      | Chronische Leberschädigung.....                                   | 86         |
| 4.3      | Das Chemokin CXCL4 .....  | 88         |
| <b>5</b> | <b>Literaturverzeichnis .....</b>                                 | <b>91</b>  |
|          | <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>                                | <b>107</b> |
|          | <b>Danksagung.....</b>  | <b>109</b> |

## Zusammenfassung

Die Leber spielt auf Grund ihrer anatomischen Lokalisation eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr. Aus diesem Grund sind in der Leber viele verschiedene Immunzellpopulationen, wie z.B. Makrophagen, T-Zellen oder auch NK-Zellen vorhanden. Ebenso, können bei einer Schädigung der Leber, weitere Immunzellen aus dem peripheren Blut in diese rekrutiert werden. Dies wird durch ein komplexes Chemokin Liganden-Rezeptorsystem reguliert.

In der vorliegenden Arbeit wird die Rolle des Chemokinrezeptors CXCR3 und dessen Liganden CXCL4, CXCL9, CXCL10 und CXCL11 während der akuten und chronischen Lebererkrankung untersucht. Dafür wurden *in vivo* Experimente in CXCR3 knockout Mäusen durchgeführt. Die so erhaltenen Daten wurden mit humanen Proben und mit *in vitro* Experimenten überprüft.

Während der akuten, CCl<sub>4</sub> induzierten Leberschädigung konnte nachgewiesen werden, dass der Chemokinrezeptor CXCR3 essentiell für die Rekrutierung von NK- und NKT-Zellen ist. Die verringerte Anzahl dieser Zellen ging mit einem verstärkten nekrotischen Schaden und somit mit einer erhöhten intrahepatischen HMGB1 Konzentration einher. Dies führte zu einer Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die geschädigte Leber, wo diesen dann den Schaden verstärkten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Chemokin CXCL9 und dessen Rezeptor CXCR3 wichtige Regulatoren der murinen Leberfibrose und der HCV induzierten Leberfibrose im Menschen darstellen. CXCR3 *knockout* Mäuse entwickelten, im Vergleich zu Wildtypmäusen, eine starke Fibrose, welche mit einer reduzierten Infiltration von IFN- $\gamma$  produzierenden T-Zellen einhergeht. Bei der humanen HCV induzierten Leberfibrose steigt die Konzentration des Chemokins CXCL9 mit fortschreitender Fibrose an. Mittels *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass das Chemokin CXCL9 antifibrotische Effekte in Sternzellen vermittelt.

Ebenso konnte gezeigt werden, dass auch das Chemokin CXCL4 und somit auch Thrombozyten, bei chronischen Lebererkrankungen involviert sind, wobei der Ursache der Schädigung ein Nebenaspekt zu sein scheint. So konnte bei

der HCV induzierten Fibrose gezeigt werden, dass Thrombozyten sich in direkter Nähe von Kollagenfasern befinden. Außerdem stieg die CXCL4 Konzentration mit fortschreitender Fibrose an. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass dieses Chemokin profibrogene Effekte *in vitro* aufweist.

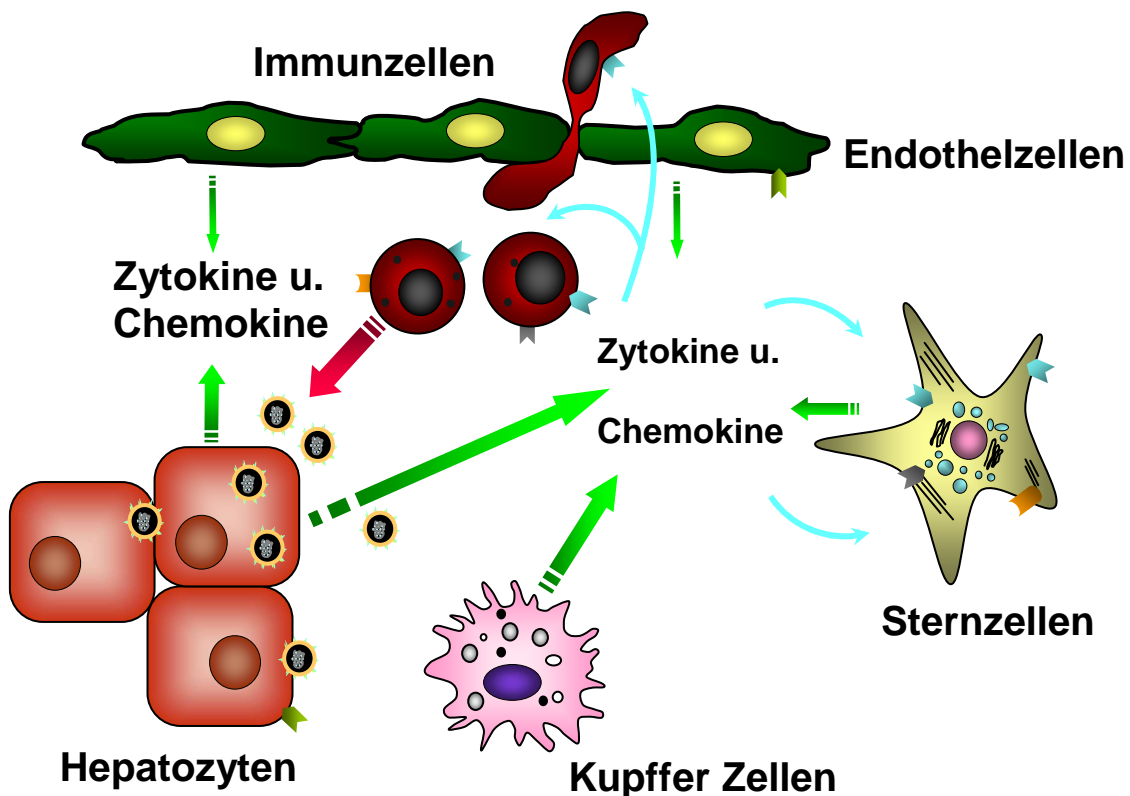
Die in Rahmen der hier vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen eine unerwartete positive Rolle des Rezeptors CXCR3 während der akuten toxischen Leberschädigung, welche man bei zukünftigen Behandlungen mit CXCR3 Antagonisten nicht außer Acht lassen sollte. Ebenso wurden antifibrotische Signalwege in der Leber beschrieben, die auf Chemokine zurückgeführt werden konnten, welche den Grundstein für potentielle antifibrotische Therapien sein könnten. Abschliessend wurde den Thrombozyten eine wichtige Rolle bei der chronischen Leberschädigung nachgewiesen und somit eine neues mögliches Ziel bei antifibrotischen Therapien identifiziert.



## 1 Einleitung

Die Leber spielt auf Grund ihrer anatomischen Lokalisation nicht nur eine wichtige Rolle beim Stoffwechsel, sondern auch bei der angeborenen Immunabwehr [1]. Da die Leber nicht nur über die Arteria Hepatica, sondern auch über die Vena Porta (Pfortader) mit Blut versorgt wird, ist sie vielen verschiedenen Substanzen ausgesetzt. Neben Nährstoffen, die über den Darm aufgenommen werden, gelangen so aber auch Toxine (z.B. Alkohol), Bakterien oder Viren in die Leber [2].

Dort schädigen diese Substanzen die Hepatozyten, welche einen großen Bestandteil, bis zu 70 %, der Leber ausmachen [3]. Die geschädigten oder zerstörten Hepatozyten sezernieren verschiedene Zytokine und Chemokine [4-6], welche hepatische Sternzellen und leberresidente Immunzellen, wie z.B. Kupfferzellen aktivieren; diese wiederum sezernieren dann ebenfalls Zytokine und Chemokine [3, 7-8].

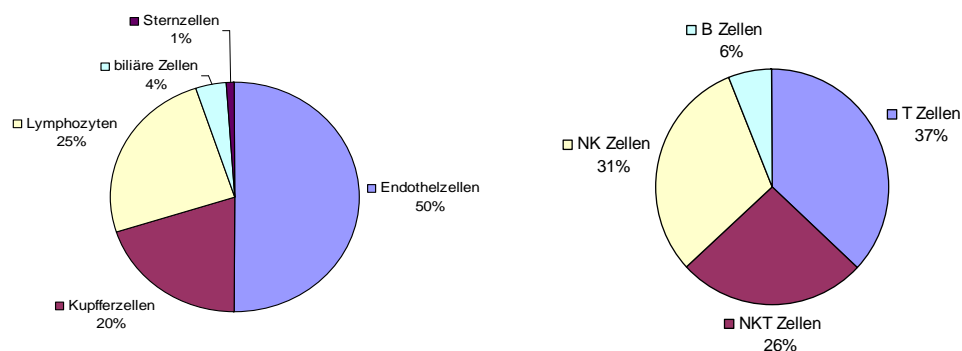


**Abb.1:** Schematische Darstellung der Abläufe innerhalb der geschädigten Leber. Überarbeitet nach Wasmuth *et. al.* [9]

Ebenso werden, durch sezernierte Zytokine und Chemokine, Immunzellen aus dem Blut, wie z.B. Makrophagen, T-Zellen oder NK-Zellen in die Leber, zum Ort der Schädigung, rekrutiert [3]. Die aktivierten Sternzellen produzieren unter anderem Kollagen, welches im Rahmen der Wundheilung in der Leber akkumuliert [3]. Falls die Schädigung der Leber über einen längeren Zeitraum andauert, entwickelt sich eine Leberfibrose an deren Endpunkt die Leberzirrhose steht [10].

## 1.1 Das Immunsystem

Da die Leber auf Grund ihrer anatomischen Lage permanent diversen Antigenen ausgesetzt ist, hat sie auch eine wichtige Rolle in der Immunabwehr. So enthält die gesunde Leber neben überwiegend Hepatozyten [3] auch eine sehr große Anzahl von Immunzellen [1]. Zusätzlich durchwandern, mittels des Blutflusses,  $10^8$  Lymphozyten die Leber innerhalb von 24 Stunden [11].



**Abb.2:** Ungefähre Verteilung der nicht parenchymalen Zellpopulationen in der gesunden menschlichen Leber (links) Verteilung der hepatischen Lymphozyten Subpopulationen (rechts), Daten überarbeitet nach Sheth K. [12] und Racanelli V. [13]

Die Eigenschaften und Funktionsweisen einiger der in Abbildung 2 dargestellten Immunzellen werden in den folgenden Abschnitten etwas genauer beschrieben.

### 1.1.1 Kupfferzellen

Kupfferzellen sind leberresidente Makrophagen, welche ca. 20% der nicht parenchymalen Zellen der Leber ausmachen (Abb.2). Sie befinden sich überwiegend in den Lebersinusoiden, den Kapillaren der Leber [13]. An dieser Stelle können sie ihre Aufgaben, wie z.B. Phagozytose von apoptotischen Zellen oder Mikroorganismen optimal erfüllen [14]. Beruhend auf diesen Effekt erklärt sich auch eine weitere Funktion der Kupfferzellen. Die phagozytierten Antigene werden auf der Oberfläche präsentiert und anschließend T- Zellen aktiviert [12]. Somit sind die Kupfferzellen auch antigenpräsentierende Zellen, durch welche nicht nur die spezifische Immunabwehr sondern auch die Immuntoleranz beeinflusst wird [15]. Kupfferzellen sind außerdem in der Lage, viele verschiedene Zytokine wie z.B. IL-1, IL-6 oder TNF- $\alpha$  und auch Chemokine, wie z.B. CXCL1, CCL3 oder CCL5 zu produzieren. So können nach einer Schädigung der Leber weitere Immunzellen, wie z.B. neutrophile Granulozyten aus dem peripheren Blut in die Leber rekrutiert werden [3].

### 1.1.2 neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten sind ein wichtiger Teil der angeborenen Immunabwehr [16] und zirkulieren im peripheren Blut. Ihre eigentlichen Hauptaufgaben sind das Abtöten von extrazellulären Bakterien sowie die Stimulation von weiteren Immunzellen durch Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen [13].

Neutrophile Granulozyten werden durch Zytokine wie z.B. TNF- $\alpha$ , aber auch durch Chemokine wie z.B. CXCL1 in die geschädigte Leber rekrutiert, wo sie zuerst in den Sinusoiden akkumulieren [17]. Von dort aus wandern sie dann in das umliegende Gewebe. Dieser Schritt wird durch  $\beta_2$  Integrine ermöglicht [18]. Anschließend wandern die neutrophilen Granulozyten zu den geschädigten Hepatozyten, da diese ebenfalls Chemokine, wie z.B. CXCL1 oder IL8 produzierten [19]. Mittels des Zelladhäsionsmoleküls ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule-1*) interagieren die neutrophilen Granulozyten mit den geschädigten Hepatozyten [20] und lösen dort einen oxidativen Stress aus, welcher zum Tod der Hepatozyten führt [17].

Dieser Mechanismus ist unter bestimmten Umständen dafür verantwortlich, dass der eigentliche, initiale Leberschaden weiter verstärkt wird [20]. So konnte in verschiedenen Experimenten, wie z.B. bei der Ischämie-Reperfusion [21], bei alkoholischer Hepatitis [22] oder bei Intoxikation durch Paracetamol [23] auf Grund der Zytotoxizität der neutrophilen Granulozyten, ein verstärkter Leberschaden nachgewiesen werden.

### 1.1.3 NK- Zellen

Eine weitere wichtige Immunzellpopulation der angeborenen Immunabwehr sind die NK-Zellen (**n**atürliche **K**illerzellen) [24], welche ca. 30% der hepatischen Lymphozyten ausmachen (Abb.2). Beim Menschen kann man NK-Zellen unter anderem durch den Oberflächenrezeptor CD56 identifizieren [25], während bei der Maus überwiegend NK1.1 verwendet wird [26].

Neben der großen Anzahl an intrahepatischen NK-Zellen, können aber auch noch weitere NK-Zellen aus dem peripheren Blut in die Leber rekrutiert werden. Dies wird durch die Chemokine CCL3, CXCL9 und CXCL10 vermittelt [27], indem sie an ihre Rezeptoren CCR1, CCR5 und CXCR3, welche ebenfalls von NK-Zellen exprimiert werden [28], binden.

Die Hauptaufgaben der NK-Zellen sind das Abtöten von Virus infizierten Zellen [3], von Tumorzellen [29], von gestressten Zellen [30] und im Rahmen der Leberfibrose das Abtöten von aktivierten Sternzellen [31]. Des Weiteren produzieren aktivierte NK-Zellen eine große Menge an proinflammatorischen Zytokinen, wie z.B. IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$  [32]. Diese Vorgänge werden durch eine Reihe von inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren, den sogenannten KIRs (***K**iller cell **i**mmunoglobulin-**l**ike **r**eceptors*) [33], welche zur Gruppe der MHC Klasse I (***M**ajor **H**istocompatibility **C**omplex*) Rezeptoren gehören [29], reguliert [34]. Gesunde Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche genügend inhibierende MHC Klasse I Moleküle, sodass sie von den NK-Zellen nicht angegriffen werden [29]. Dies wird auch als „missing self“ Hypothese bezeichnet [35]. Wenn nun z.B. ein Hepatozyt von einem Hepatitis C Virus infiziert [36] oder eine Sternzelle aktiviert wird [37], dann exprimieren diese weniger inhibierende MHC Klasse I Moleküle [36] und die NK-Zellen werden aktiviert. In den Zielzellen wird

dann über den Fas/FasL Signalweg [38] oder über den Perforin/Granzym Signalweg [24] die Apoptose ausgelöst.

#### 1.1.4 T- Zellen

Die größte Immunzellpopulation der Lymphozyten in der Leber sind die T-Zellen (Abb.2). Man kann sie anhand des CD3 Oberflächenrezeptors identifizieren [39]. Die intrahepatische T-Zellpopulation ist sehr heterogen. Es gibt  $CD4^+$  T-Helferzellen und zytotoxische  $CD8^+$  T-Zellen, wobei es überwiegend mehr  $CD8^+$  T-Zellen als  $CD4^+$  T-Zellen in der Leber sind [39]. Eine andere große Gruppe der T-Zellen sind die so genannten NKT-Zellen (**N**atürliche **K**iller **T**-Zellen), welche bis zu 26% der intrahepatischen Lymphozyten ausmachen (s.Abb.2). Diese Zellen exprimieren neben typischen T-Zellrezeptoren (CD3) auch noch NK-Zellrezeptoren (CD56) [24]. Neben diesen großen T-Zellsubpopulationen gibt es auch noch die kleine, aber wichtige Population der regulatorischen T-Zellen. Diese machen zwar nur 0,5 % bis 1 % der intrahepatischen Lymphozyten aus [40], können aber sehr effektiv eine Immunantwort wieder supprimieren [40].

Ebenso wie die anderen beschriebenen Immunzellen, können auch weitere T-Zellen in die Leber rekrutiert werden. Dies geschieht durch die von den T-Zellen exprimierten Chemokinrezeptoren CCR5 [14, 41-42] und CXCR3 [43-44] und deren korrespondierenden Liganden z.B. CCL5 [45] und CXCL10 [46].

Auf Grund der Heterogenität innerhalb der T-Zellen, haben diese unterschiedliche Aufgaben. Um diese erfüllen zu können, müssen die T-Zellen aber erst aktiviert werden. Dies geschieht bei  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen über den so genannten T-Zellrezeptor TCR (*T cell receptor*) [39]. Bei NKT-Zellen wird der T-Zellrezeptor als  $V\alpha 24J\alpha 18$  bezeichnet [47]. Nach der Aktivierung können die T-Zellen dann die Differenzierung von B-Zellen fördern [12], infizierte Zellen mittels Apoptose abtöten [48] und schnell große Mengen an Zytokinen sezernieren [12]. Die Apoptose in den Zielzellen wird ähnlich wie bei den NK-Zellen (s.1.1.3) entweder über den Fas/FasL Signalweg [49] oder den Perforin/Granzym Signalweg [50] ausgelöst. Des Weiteren kann je nachdem welche Zytokine sezerniert werden, kann die Immunantwort reguliert variieren.

Sezernieren die T-Zellen überwiegend IFN- $\gamma$ , dann wird eine TH1 assoziierte Immunantwort ausgelöst. Wird hingegen überwiegend IL-4 sezerniert, dann wird eine TH2 assoziierte Immunantwort ausgelöst [12].

Abschließend werden die aktivierten T-Zellen ihrerseits durch Apoptose abgetötet [51]. Der Mechanismus ist noch nicht eindeutig geklärt, aber vermutlich erhalten die aktivierten T-Zellen die apoptotischen Signale von leberresidenten Zellen, wie z.B. Hepatozyten [52].

### 1.1.5 Thrombozyten

Thrombozyten, auch Blutplättchen genannt, entstehen durch Abschnürungen von Megakaryozyten und besitzen keinen Zellkern [53]. Sie können aber trotzdem, in einem begrenzten Umfang, Proteine synthetisieren, da sie ca. 3000 bis 6000 mRNS Kopien [54] und einen Translationsapparat besitzen [55]. Man kann Thrombozyten mit Hilfe des Oberflächenrezeptors CD41 identifizieren [56] und zur Identifizierung von aktivierten Thrombozyten wird zusätzlich noch der Rezeptor CD62p [57] verwendet.

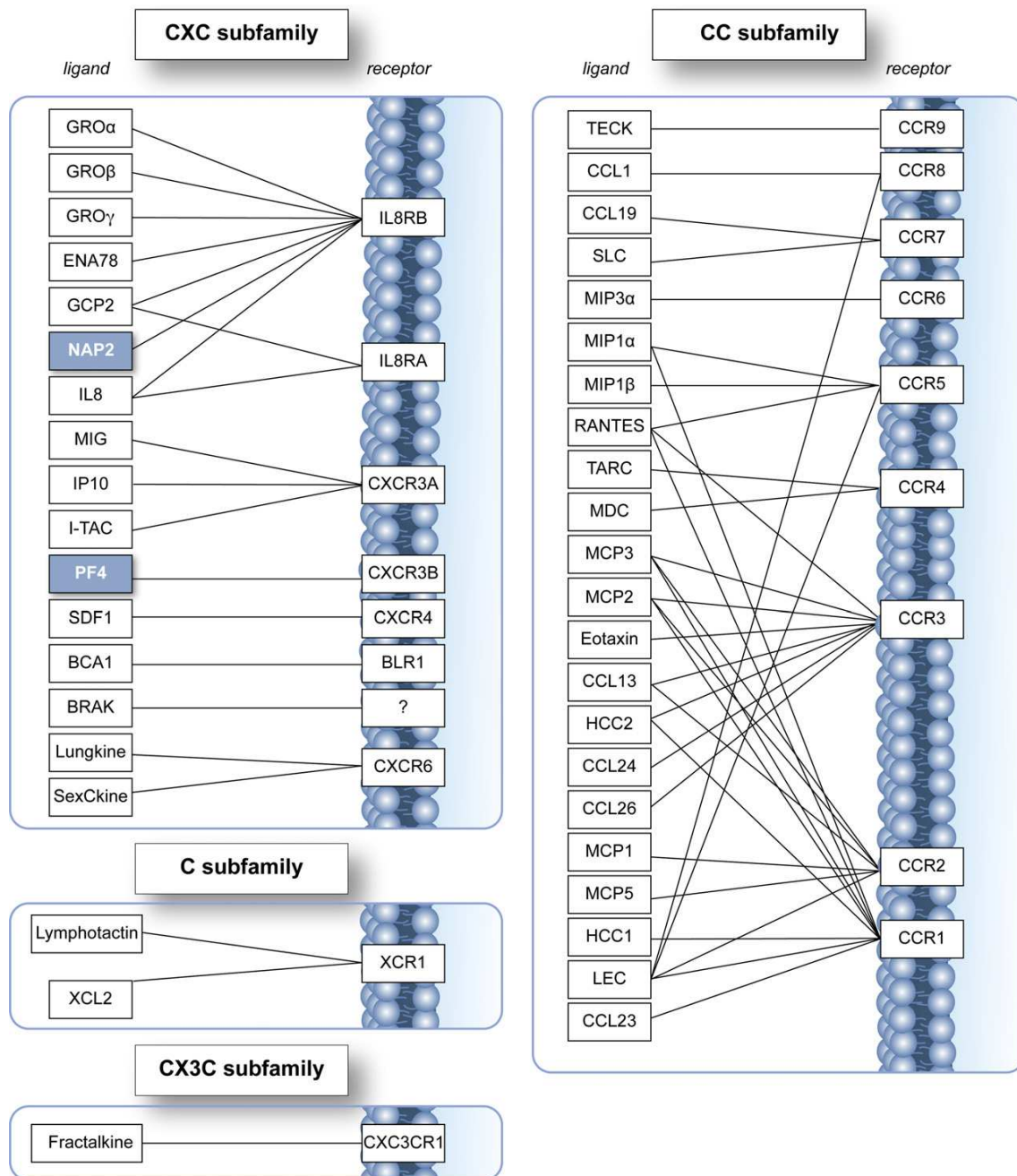
Thrombozyten sind die ersten Zellen, die zu einer Verletzung rekrutiert werden [31]. Dort werden diese dann aktiviert und bilden einen Thrombus, welcher die Verletzung verschließt [58]. Zusätzlich sezernieren die Thrombozyten große Mengen an Wachstumsfaktoren, wie z.B. PDGF (*platelet derived growth factor*), um die Wundheilung zu stimulieren [31]. Außerdem werden auch noch Chemokine, wie z.B. CXCL4 oder CXCL7, welche in den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten gespeichert sind, ausgeschüttet [59]. Durch diese Chemokine werden zusätzlich auch noch weitere Immunzellen, wie z.B. neutrophile Granulozyten, zum Ort der Verletzung rekrutiert [60-61].

## 1.2 Zytokine und Chemokine

Wie schon erwähnt, werden Zytokine oder Chemokine von geschädigten Hepatozyten, aktivierten Sternzellen und Immunzellen sezerniert. Zytokine sind Glykoproteine, welche vor allem die Proliferation und Differenzierung von Zellen beeinflussen bzw. regulieren (<http://www.copewithcytokines.de>). Zu den Zytokinen gehören unter anderem Interferone oder Interleukine. Interferon  $\gamma$  zum Beispiel fördert die Differenzierung von T-Zellen hin zu einem TH1 assoziiertem Phänotyp, während Interleukin 4 hingegen die Differenzierung zu einem TH 2 assoziiertem Phänotyp vermittelt [62].

Chemokine sind Zytokine mit chemotaktischen Eigenschaften. Sie rekrutieren Immunzellen entlang eines chemotaktischen Gradienten hin zum Ort der Produktion [63] z.B. Makrophagen hin zu den geschädigten Hepatozyten.

Chemokine können auf Grund ihres biochemischen Aufbaus grob in vier Gruppen eingeteilt werden. Man unterscheidet sie in C, CC, CXC und CX3C Chemokine [63]. Diese Klassifizierung erfolgt auf Grund des konservierten N-terminalen Cysteinrestes: Die Klasse der C Chemokine hat nur einen einzigen Cysteinrest, die CC Chemokine haben zwei nebeneinander gelagerte Cysteinreste, die CXC Chemokine haben zwischen den beiden konservierten Cysteinresten eine nicht konservierte Aminosäure (X) und die CX3C Chemokine haben zwischen den beiden konservierten Csyteinresten drei nicht konservierte Aminosäuren (X3) [64]. Zur Zeit sind mehr als 50 verschiedene Chemokine und 19 verschiedene Rezeptoren (Abb.3) bekannt [63].



**Abb.3:** Darstellung der verschiedenen Chemokine und ihrer Rezeptoren [65]. Die blau gefärbten Chemokine werden überwiegend von Thrombozyten sezerniert. Die Nomenklatur der einzelnen Chemokine kann dem Abkürzungsverzeichnis (s. S. 106) entnommen werden.



Wie man der Abb.3 [65] entnehmen kann, sind die größten Familien die der CC und CXC Chemokine, welche im Rahmen von akuten und chronischen Entzündungsreaktionen in der Leber eine wichtige Rolle spielen.

### **1.2.1 Der Chemokinrezeptor CXCR3**

Der Chemokinrezeptor CXCR3 besteht aus 368 Aminosäuren, mit einem daraus resultierenden Molekulargewicht von ca. 40 Kilodalton (kDa) [66]. CXCR3 gehört zu der Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren und hat sieben transmembrane Domänen. Die drei extrazellulären N-terminalen Domänen sind für die Bindung der Liganden verantwortlich. Die drei intrazellulären C-terminalen Domänen sind für die Signaltransduktion in die Zelle verantwortlich [66]. Wenn der Ligand an den Rezeptor bindet, dann kommt es zu einem Kalziumeinstrom in die Zelle und nachfolgend zu einer Aktivierung von Signalkaskaden, wie z.B. von *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) oder auch zu einer Phosphorylierung von Akt. Dies wiederum führt zu einem Umbau des Zytoskelettes und somit zur Bewegung, d.h. Chemotaxis von Immunzellen [66].

Im Jahr 2003 entdeckten Lasagni und seine Mitarbeiter eine alternative *Splice*-Variante des Rezeptors, welche sie CXCR3-B nannten [67]. Somit gibt es 2 verschiedene Rezeptorvarianten beim Menschen, welche als CXCR3-A und CXCR3-B bezeichnet werden. An den Rezeptor CXCR3-A binden mit hoher Affinität 3 Interferon  $\gamma$  induzierbare Liganden: CXCL9 (MIG: monokine induced by IFN-  $\gamma$ ), CXCL10 (IP-10: IFN-  $\gamma$ -induced protein) und CXCL11 (I-TAC: IFN-  $\gamma$  inducible T cell  $\alpha$  chemoattractant), während an CXCR3-B überwiegend das Chemokin CXCL4 bindet [67]. Diese zwei Varianten des Rezeptors wurden bisher nur für den Menschen beschrieben. Bei Mäusen hingegen wurde noch keine alternative Variante des Rezeptors entdeckt und auch kein anderer Rezeptor an dem CXCL4 binden kann [68].

Der Rezeptor CXCR3 wird von Endothelzellen [69] aber auch von Immunzellen wie z.B. T-Zellen, NK-Zellen und NKT-Zellen exprimiert [44, 66, 70], wodurch die Migration der Immunzellen durch das Endothel hin zu den geschädigten

Organen ermöglicht wird [71]. Aber auch weitere Zellen wie z.B. hepatische Sternzellen [72], Neuronen [73] und Tumorzellen [74] exprimieren den Chemokinrezeptor CXCR3.

Im folgenden Abschnitt werden verschiedene Effekte der Liganden näher beschrieben.

### **1.2.2 Liganden des Chemokinrezeptors CXCR3**

Wie schon erwähnt sind die Chemokine CXCL4, CXCL9, CXCL10 und CXCL11 die Liganden des Rezeptors CXCR3 [67].

Die Produktion der Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11 kann durch das proinflammatorische Zytokin Interferon  $\gamma$  induziert werden [66]. Diese Chemokine können von verschiedenen Zellen in verschiedenen Organen produziert und sezerniert werden. So konnte die Expression der Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11 z.B. in Astrozyten [75], in Endothelzellen [3], in renalen Tumorzellen [76] und in Hepatozyten [5] nachgewiesen werden.

Diese Tatsache weist auf den ersten biologischen Mechanismus des CXCR3 Rezeptor-Liganden System hin, die Rekrutierung von Immunzellen [66]. Das Chemokin CXCL9 rekrutiert sehr effektiv NKT-Zellen und NK-Zellen hin zu dem Ort der Entzündung [77]. Auch für CXCL10 ist bekannt, dass es neben NK- und NKT-Zellen auch die Migration von T-Zellen positiv beeinflusst [46]. Die gleichen Effekte wurden auch für CXCL11 beschrieben [75]. Des Weiteren wird durch diese TH1 assoziierten, CXCR3 exprimierenden Immunzellen, wiederum Interferon  $\gamma$  produziert, wodurch die Expression der Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11 wieder verstärkt wird und noch mehr Immunzellen rekrutiert werden. Somit kann man von einer sich positiv verstärkenden Rückkopplung reden.

Ein weiterer biologischer Mechanismus, den CXCR3 und seine Liganden vermitteln, ist neben der Rekrutierung von Immunzellen außerdem die Vermittlung von starken angiostatischen Effekten. So konnte in Tierversuchen, bei welchen Mäusen CXCL10 und CXCL 11 injiziert wurde, gezeigt werden, dass die Neoangiogenese gehemmt wurde [78], [79].

Ein weiterer Ligand, welcher an der 2. *Splice Variante* des Rezeptors bindet, ist das Chemokin CXCL4 (PF4: *platelet factor 4*). Die Hauptquellen dieses Chemokins sind aktivierte Thrombozyten [80]. Der Ligand vermittelt ebenfalls die Rekrutierung von Immunzellen wie z.B. neutrophilen Granulozyten oder Monozyten [60]. Des Weiteren verhindert das Chemokin CXCL4 die spontane Apoptose von Monozyten und induziert deren Differenzierung hin zu Makrophagen [81]. Eine zusätzliche außergewöhnliche Funktion des Chemokins ist die heterophile Interaktion mit anderen Chemokinen. Es kann mit den Chemokinen CCL5 und CXCL8 interagieren und somit die über deren Rezeptor vermittelten Effekte verstärken [82-83].

Außerdem vermittelt CXCL4, ebenso wie die Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11, starke angiostatische Effekte indem es die proangiogenen Effekte von z.B. VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) hemmt [63].

### **1.3 Bisherige Forschungsergebnisse**

Die Rolle des Chemokinrezeptors CXCR3 und dessen Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 während der akuten Leberschädigung wurde schon mit Hilfe verschiedener Tierversuche beschrieben. In einem Experiment wurde der Einfluss des Chemokinrezeptors CXCR3 auf eine Ischämie/Reperfusion (I/R) Verletzung der Leber in Ratten untersucht [43]. Diese Art der Verletzung tritt nach einer Transplantation auf und ist der Hauptgrund für das Absterben des transplantierten Organs [84]. Bei diesem Experiment konnte eine erhöhte intrahepatische Expression der Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11 festgestellt werden. Diese resultierte in einer verstärkten Rekrutierung von CXCR3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen, welche zur Schädigung beigetragen haben. Im Gegensatz dazu führte eine Blockade des CXCR3 Rezeptors zu einem geringen Schaden, welcher mit einer reduzierten Rekrutierung von CXCR3<sup>+</sup> T-Zellen einher ging. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei I/R Verletzungen in anderen Organen, wie z.B. der Niere [84] oder des Herzens [45] beobachtet. In der geschädigten Niere konnte ebenfalls eine gesteigerte Expression der Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11 festgestellt werden, wohingegen

CXCR3 *knockout* Mäuse weniger Schaden aufwiesen und so mehr Tiere überlebten. Bei dem zweiten Experiment wurden die Mäuse mit einem CXCR3 Inhibitor behandelt, was ebenfalls zu einer geringeren Infiltration von T-Zellen und einem besseren Überleben der Tiere, im Vergleich zu denen, den der Inhibitor nicht injiziert wurde, führte. In einem anderen Experiment wurden Mäuse mit einem Adenovirus infiziert [85]. Die Infektion resultierte in einer verstärkten intrahepatischen IFN- $\gamma$  Expression. Dies wiederum führte zu einer erhöhten CXCL9 Expression, wodurch mehr CXCR3<sup>+</sup> T-Zellen in die infizierte Leber rekrutiert wurden und diese dann schädigten.

Die meisten dieser Experimente untersuchten die Rolle des CXCR3 Rezeptors in Bezug auf T-Zellen. Zwar wurden auch einige Versuche durchgeführt, um die Rolle der NK-Zellen zu klären, aber nicht im Zusammenhang mit dem CXCR3 Rezeptor. So wurden Mäuse mit dem murinen Hepatitis Virus MHV-3 infiziert, wodurch ein akutes Leberversagen ausgelöst wurde [38]. Dies ging mit einer erhöhten Anzahl von NK-Zellen in der Leber einher, welche auch den Schaden vermittelten. Eine Depletion der NK-Zellen führte zwar zu einem höheren Virus Titer, dafür überlebten jedoch mehr infizierte Tiere. In einem weiteren Experiment wurde bei Mäusen eine starke Hepatitis ausgelöst [86]. Dafür wurde den Tieren Inosin-Cytidil Polyribose Säure, poly I:C (*polyinosinic:polycytidylic*) injiziert. Dadurch wurden die NK-Zellen aktiviert und die Leber von diesen aktivierten NK-Zellen massiv geschädigt.

T-Zellen und NK-Zellen haben aber nicht nur negative Effekte. Mäuse, die mit Cholindefizientem Futter welches mit Ethionin ergänzt wurde (CDE Diät), gefüttert wurden, hatten einen durch Steatose verursachten Leberschaden [87]. Gleichzeitig zeigten Wildtypiere im Vergleich zu *knockout* Mäusen, die keine T- und NK-Zellen hatten, eine erhöhte Proliferationsrate der hepatischen Stammzellen, den Oval Zellen. Somit scheinen die T-Zellen und NK-Zellen auch eine wichtige Rolle bei der Leberregeneration einzunehmen.

Auch bei chronischen Erkrankungen, wie z.B. dem Hepatozellulärem Karzinom HCC (*Hepatocellular carcinoma*), welches die Endstufe einer chronischen Leberentzündung ist [88], spielen der Chemokinrezeptor CXCR3 und dessen Liganden eine wichtige Rolle. So konnte man im Serum von Patienten, welche

an HCC erkrankt sind, erhöhte Spiegel der Chemokine CXCL9 und CXCL 10 nachweisen [89]. Zudem wurde in den Tumoren eine erhöhte CXCL 10 Konzentration nachgewiesen. In einer weiteren Untersuchung konnte auch eine erhöhte Expression des Rezeptors CXCR3 in den Tumoren nachgewiesen werden, wobei die CXCR3 Expression positiv mit der tumorfreien Zeit der Patienten korrelierte [90]. Ähnlich Resultate wurden bei der Untersuchung des Nierenzellkarzinoms RCC (*renal cell carcinoma*) erzielt [76]. Die Expression des Rezeptors CXCR3 und der Chemokine CXCL9 und CXCL10 war in den Tumoren stark erhöht. Mittels Tierversuchen bei Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass durch diese zwei Chemokine überwiegend aktivierte CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen rekrutiert wurden, welche wiederum das Tumorstadium stoppten und die Tumorrogression förderten [91-92]. Weitere Experimente untersuchten die CXCR3 vermittelten Effekte während der Fibrose. So wurde in CXCR3 *knockout* Mäusen zum einen eine Nierenfibrose [93] und zum anderen eine Lungenfibrose [94] ausgelöst. In beiden Versuchen entwickelten die CXCR3 *knockout* Tiere eine verstärkte Fibrose. Ebenso konnten dem Chemokin CXCL10 antifibrotische Effekte nachgewiesen werden [78, 93]. Das Gegenteil wurde aber in einem Tierversuch mit CXCL10 *knockout* Mäusen, in Bezug auf die Leberfibrose, gefunden [95]. Diese Tiere entwickelten eine geringere Fibrose im Vergleich zu den Wildtypmäusen. Die Forscher führen es auf die vermehrte Rekrutierung von NK-Zellen in die fibrotischen Lebern der *knockout* Tiere zurück, wo diese dann die aktivierten Sternzellen mittels Apoptose abtöten [96] und somit die Fibrose weniger stark ausgebildet ist.

Die Rolle der Thrombozyten und somit auch die des Chemokins CXCL4, bei der Leberschädigung, sind erst seit kurzem in den Fokus der Wissenschaft gerückt, daher gibt es noch relativ wenige Erkenntnisse. Es konnte in Tierversuchen mit Mäusen nachgewiesen werden, dass Thrombozyten bei akuter viraler Hepatitis aktiv in die Leber rekrutiert werden und diese dann schädigen [97-98], wobei dieser Umstand zum Teil auf das von den Thrombozyten sezernierte Serotonin zurückgeführt werden konnte [98]. Im Gegensatz dazu konnte aber in anderen Experimenten gezeigt werden, dass das von den Thrombozyten sezernierte Serotonin die Leberregeneration nach partieller Hepatektomie fördert [99]. Das

Chemokin CXCL4 konnte mittels *in vitro* [100] und *in vivo* [68] Experimenten mit chronischen inflammatorischen Krankheiten wie z.B. der Arteriosklerose in Verbindung gebracht werden. So korrelierte die CXCL4 Konzentration im ersten Experiment mit der Schwere der Arteriosklerose. Bei dem zweiten Experiment konnte gezeigt werden, dass CXCL4 *knockout* Mäuse eine weniger schwere Arteriosklerose, als die Wildtypiere, entwickelten. Aber auch bei Lebererkrankungen, wie z.B. alkoholischer oder viraler Hepatitis scheint des Chemokin CXCL4 eine wichtige Rolle zu spielen. So konnte bei Patienten mit alkoholischer Hepatitis eine erhöhte intrahepatische CXCL4 Expression gemessen werden [101]. Ebenso wurden bei Patienten, die unter einer viralen Hepatitis litten, eine erhöhte CXCL4 Konzentrationen im Serum nachgewiesen [102].

## 1.4 Zielsetzung

Basierend auf den bisherigen Forschungsergebnissen wird in der vorliegenden Arbeit die Rolle des Chemokinrezeptors CXCR3 und dessen Liganden im Rahmen der akuten und chronischen Leberschädigung untersucht.

Zum einen wird der Effekt des Rezeptors während der akuten, durch Tetrachlorkohlenstoff, induzierten Leberschädigung im Tierversuch untersucht. Ein besonderes Augenmerk wird auf die Rekrutierung von Immunzellen, in die geschädigte Leber, gelegt. Wobei der Fokus besonders die Immunzellpopulation der NK-Zellen liegt.

In einem weiteren Experiment wird der Einfluss des Rezeptors CXCR3 auf die Leberfibrose untersucht. Dafür wird in Mäusen durch die wiederholte Injektion von Tetrachlorkohlenstoff bzw. Thioacetamid eine Leberfibrose induziert. Zusätzlich werden, basierend auf den Tierversuchen, humane Leberbiopsie und Serumproben hinsichtlich der Expression bzw. Konzentration der Liganden des Rezeptors CXCR3 untersucht. Diese Ergebnisse werden dann *in vitro* weiter analysiert.

Weiterhin wird die Rolle der Thrombozyten und des Chemokins CXCL4 im Rahmen der durch Hepatitis C induzierten Fibrose, an hand von humanen Leberbiopsie- und Serumproben, untersucht. Dafür wird die CXCL4 Serumkonzentration und die intrahepatische CXCL4 Expression ermittelt und mit dem Schweregrad der Fibrose korreliert. Abschließend werden die durch CXCL4 vermittelten Effekte auf hepatische Sternzellen *in vitro* analysiert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Liste der verwendeten Materialien

#### 2.1.1 Liste der verwendeten Laborgeräte

|   |                       |
|---|-----------------------|
| Brutschrank   |                       |
| ELISA-Reader $\mu$ Quant                                  | Biotec                |
| Eppendorf-Zentrifuge                                      | Eppendorf             |
| Gefrierschrank -80°C                                      | Bosch                 |
| Gelkammer Apagel Maxi                                     | Biometra              |
| Gerät zur Einengung unter<br>Stickstoff Reacti Therm 3000 | Piece                 |
| FACS-Gerät FACS Canto II                                  | BD; Bioscience        |
| Färbeküvetten   |                       |
| Feinwaage ALJ220-NM                                       | Kern                  |
| Kühlschrank   | Bosch                 |
| Kryotom HM 550  | Microm                |
| Messzylinder Glas   | Brand                 |
| pH-Meter  | Calimatic Knick       |
| Photometer Ultrospec 200                                  | Pharmacial Biotec     |
| Ofen  | Hereaus               |
| RT-PCR  |                       |
| 7000SequenceDetectionSystem                               | Applied biosystems    |
| Teflonhomogenisator                                       | Heidolph              |
| Thermocycler für PCR T3000                                | Thermocycler Biometra |
| Thermomixer   | Comfort; Eppendorf    |
| Tischzentrifuge   | Labnet International  |
| Ultra-Torrax T  | IKA-Werke             |
| Vortexer Vortex Genie II                                  | Scientific Industries |
| Waage   | Sartorius             |



### 2.1.2 Liste der verwendeten Gebrauchsmaterialien

|                              |                                 |
|------------------------------|---------------------------------|
| 0,2ml 8 strip PCR-Tubes      | Starlab                         |
| 10ml Glaspipette             | Stripette Costar corning        |
| 96-Well-PCR-Platte           | PCR-Plate semiskrated, Starlab  |
| Deckgläser                   | AutomatStar                     |
| ELISA-Platte                 | 1x8 Costar, Stripwell-Plate     |
| Eppendorfreaktiongefäß 1,5ml | Eppendorf                       |
| Falcon-Tubes (15ml+50ml)     | cellstar-tubes Greiner; Bio-One |
| Filter                       | Sartorius                       |
| Handschuhe Latex             | Semper Care                     |
| Handschuhe Nitril            | Semper Care                     |
| Kanülen                      | Mikrolance; BD                  |
| Küvetten                     | Sarstedt                        |
| Objektträger                 | Roth                            |
| Papierfilter                 | Macherey-Nagel                  |
| Pasteurpipetten              | Brand                           |
| Pipettenspitzen              | Starlab                         |
| Rührspatel                   | Sarstedt                        |
| Skalpelle, 11er              | Feather                         |
| Spritzen 1ml                 | Plastipak; BD                   |
| Zellsiebe 70µm               | Falcon; BD                      |

### 2.1.3 Liste der verwendeten Chemikalien

|   |               |
|---|---------------|
| Bio-Rad <i>Protein Assay</i>              | BioRad        |
| Brefeldin                                 | Sigma Aldrich |
| BSA                                       | Sigma Aldrich |
| Chloramin T                               | Sigma Aldrich |
| Chloroform                                | Roth          |
| DEPC- Wasser                              | Braun         |
| DMEM <i>high Glucose</i> mit Glutamin 4mM | PAA           |
| DTT                                       | Sigma Aldrich |
| Ehrlichs Reagenz                          | Fluka         |

---

|                                 |                   |
|---------------------------------|-------------------|
| ECL                             | Thermo Scientific |
| Eosin                           | Merck             |
| Essigsäure 100%                 | Merck             |
| Ethanol                         | AppliChem         |
| HBSS                            | PAA Laboratories  |
| Hemacolor®                      | Merck             |
| Humanes Serum                   | Sigma Aldrich     |
| Hydroxyprolin                   | Sigma Aldrich     |
| Immo Mount™                     | Vector            |
| Ionomycin                       | Sigma Aldrich     |
| Isopropanol                     | AppliChem         |
| Isofluran Florene 100%          | Abbott            |
| Kaninchenserum                  | Sigma Aldrich     |
| Kollagenase                     | Roche             |
| Lympholyte® Mammal              | Cedarlane         |
| Mausserum                       | Sigma Aldrich     |
| Mayers Hematoxylin Lösung       | Sigma Aldrich     |
| Methanol                        | VWR               |
| MOPS Puffer                     | Milipore          |
| Natriumazid                     | AppliChem         |
| Natriumchlorid                  | Sigma Aldrich     |
| Natriumcitrat                   | Sigma Aldrich     |
| Natrium Deoxycholat             | Sigma Aldrich     |
| Natriumhydroxid                 | Merck             |
| Nonidet P40                     | AppliChem         |
| NuPage LDS <i>Sample</i> Puffer | Invitrogen        |
| peqDold RNAPure™                | PEQLAB            |
| PBS                             | PAA Laboratories  |
| Penizillin / Streptavidin       | Invitrogen        |
| PFA                             | Merck             |
| PMA                             | Sigma Aldrich     |
| Rapsöl                          | Bellasan          |

|                                  |               |
|----------------------------------|---------------|
| RPMI                             | PAA           |
| Saponin                          | Sigma Aldrich |
| Salzsäure                        | AppliChem     |
| Schwefelsäure                    | AppliChem     |
| SDS                              | Sigma Aldrich |
| SYBR GreenER qPCR Supermix       | Invitrogen    |
| Tetrachlorkohlenstoff            | Merck         |
| Thioacetamid TAA                 | Sigma Aldrich |
| Tissue Tek®                      | Sakura        |
| TRIS-Puffer TRIS Pufferan >99,9% | Roth          |
| Triton X                         | AppliChem     |
| Tween R 20                       | Roth          |
| Vecta Shield®                    | Vectorlabs    |
| Wasserstoffperoxid               | AppliChem     |
| Xylol                            | AppliChem     |

#### 2.1.4 Liste der verwendeten Antikörper, Sonden und Primer

##### FACS Antikörper

|                              |                |
|------------------------------|----------------|
| Anti-Mouse CD3-APC           | eBiosciences   |
| Anti-Mouse CD45-APC-C7       | eBiosciences   |
| Anti-Mouse NK1.1-PE          | eBiosciences   |
| Anti-Mouse IFN- $\gamma$ -PE | BD Biosciences |

##### Immunfluoreszenz Antikörper

|                                  |             |
|----------------------------------|-------------|
| Mouse Anti-Human CXCL9           | R&D Systems |
| Rat Anti-Mouse Ly6G/G Gr1        | Invitrogen  |
| Rabbit Anti-Rat Alexa Fluor® 488 | Invitrogen  |

##### Western Blot Antikörper

|                           |              |
|---------------------------|--------------|
| Anti-HMGB1                | eBiosciences |
| Anti-Rabbit-HRP           | R&D Systems  |
| Anti-Kollagen1 $\alpha$ 1 | Abcam        |

##### Weitere Antikörper

|                                     |           |
|-------------------------------------|-----------|
| <i>rabbit-anti-mouse</i> ASIALO GM1 | Cedarlane |
|-------------------------------------|-----------|

### 2.1.5 Liste der verwendeten Primer

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma MWG Eurofins bezogen.

CCL5

3' TTCCCTGTCATCGCTTGCTCT 5'

5' CGGATGGAGATGCCGATTTT 3'

CCL3

3' TAGTCACTTTGCGGCTGATG 5'

5' CAGTGTCAACCCAGGGCTAT 3'

KC

3' TGCACCCAAACCGAAGTCAT 5'

5' TTGTCAGAAGCCAGCGTTCAC 3'

$\beta$ -Aktin

3' CTGACTGACTACCTCATGAAGATCCT 5'

5' CTTAATGTCACGCACGATTTCC 3'

Die Expression der folgenden Gene wurde mit Assays on Demand von der Firma Applied Biosystems ermittelt.

*Tgf- $\beta$* , *Timp-1*, *Cxcl4*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Col1a1* und *IFN- $\gamma$*

Genauere Informationen können von Internetseite <http://www.appliedbiosystems.com> entnommen werden.

### 2.1.6 Liste der verwendeten Lösungen und Puffer

#### **RIPA-Puffer**

20 mM Tris- HCl

150 mM NaCl

2 % Nonidet P40

0,1 % SDS

0,5 % Natrium Deoxycholat

#### **TBS-T**

50 mM Tris-HCL

150 mM NaCl

0,1% Tween 20

#### ***Blockingbuffer***

100 µl humanes Serum

100 µl Kaninchenserum

100 µl Mausserum

333 µl 30% BSA

4367 µl HBSS

### 2.1.7 Liste der verwendeten Kits

|   |               |
|---|---------------|
| KC ELISA Kit murin                                  | R&D Systems   |
| CXCL4 ELISA Kit murin                               | R&D Systems   |
| CXCL4 ELISA Kit human                               | R&D Systems   |
| CXCL9 ELISA Kit human                               | R&D Systems   |
| Maxima™ First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR | Fermentas     |
| In Situ Cell Death Detection Kit ®                  | Roche         |
| Naphtol-AS-D-Chloracetatesterase Kit                | Sigma Aldrich |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Tierversuche

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden vorher beim Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein - Westfalen (LANUV NRW) schriftlich beantragt und sind von diesem auch genehmigt worden (Az.: 8.87-50.10.37.09.050 und 8.87-50.10.35.09). Die CCR1 und die CCR5 *knockout* Tiere, ebenso wie die Wildtypkontrollen, wurden von der Firma Jackson Laboratory käuflich erworben. Die CXCR3 *knockout* Tiere wurden, wie schon publiziert, erzeugt [103] und im Institut für Tierversuchskunde für die Experimente gezüchtet. Die Haltung und Versorgung der Versuchstiere erfolgte im Institut für Tierversuchskunde des Universitätsklinikums Aachen. Dort wurden die Tiere bei einer durchschnittlichen Temperatur von 22°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-60% in einem 12 stündigen Hell-Dunkelrhythmus gehalten.

Zur Induzierung des akuten Leberschadens wurde 6-8 Wochen alten Tieren einmalig CCl<sub>4</sub>, mit einer Konzentration von 0,6mg/kg Körpergewicht, intraperitoneal injiziert. 24 bzw. 72 Stunden später wurden die Tiere durch cervikale Dislokation getötet. Zur Depletion der NK-Zellen wurde den Tieren 50µl des *rabbit-anti-mouse* ASIALO GM1 Antikörpers injiziert um 1 Stunde später, wie oben beschrieben, den Leberschaden auszulösen.

Zur Induktion einer Fibrose wurde 6-8 Wochen alten Tieren, zweimal pro Woche, CCl<sub>4</sub>, mit einer Konzentration von 0,6mg/kg Körpergewicht, intraperitoneal injiziert und dies über einen Zeitraum von 6 Wochen. In einem Experiment wurde 6-8 Wochen alten Tieren, dreimal pro Woche, TAA, mit einer Konzentration von 150 mg/kg Körpergewicht, intraperitoneal injiziert und dies über einen Zeitraum von 6 Wochen.

Anschließend wurden die Tiere drei Tage nach der letzten Injektion durch cervikale Dislokation getötet.

### 2.2.2 FACS Analyse

Die Tiere werden zu den oben genannten Zeitpunkten durch cervikale Dislokation getötet. Nach der Eröffnung der Peritonealhöhle und des Thorax, wird das Blut mittels Kardiozentese entnommen. Anschließend wird die Leber über die Pfortader mit 15 ml 1 x PBS perfundiert und dann entnommen. Die Gallenblase und etwaige Fettreste werden entfernt und die Leber wird nochmals in 1 x PBS gespült. Daraufhin inkubiert die Leber 40 Minuten bei 37°C in Collagenase (2mg/ml), wobei sie vorher noch mit einer Schere zerkleinert wurde. Nach der Inkubationszeit wird die Leber mit Hilfe einer Spritze geschert und dann durch ein Zellsieb, mit einer Porengröße von 70 µm, gefiltert und mit 10 ml HBSS gespült. Nun werden die gefilterten Zellen mit 6 ml Lympholyte Mammal unterschichtet und dann bei Raumtemperatur für 20 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Damit der entstehende Gradient erhalten bleibt, muss die Bremse der Zentrifuge abgeschaltet werden. Es bilden sich drei verschiedene Phasen: Die Oberphase, in welcher sich überwiegend Fett befindet, die Mittelphase, in welcher sich die zu untersuchenden Immunzellen befinden und die Unterphase, wo sich unter anderem die Hepatozyten und das restliche Lympholyte Mammal befinden. Die Ober- und Unterphase können verworfen werden. Die Mittelphase wird in ein 15 ml Falcon überführt und zweimal mit HBSS bei 4°C gewaschen. Das nun erhaltene Zellpellet wird in 200 µl *Blockingbuffer*, in welchem die entsprechenden Antikörper im Verhältnis 1:200 gelöst sind, resuspendiert und für 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Zum Schluss werden die Zellen herunter zentrifugiert, mit 1ml HBSS nochmals gewaschen und dann mit 200 µl 2% PFA fixiert. Nun können die Zellen mittels BD FACSCanto™ II gemessen und mit Hilfe des Programms FlowJo ausgewertet werden.

### 2.2.3 Intrazelluläre FACS Analyse

Die intrazelluläre FACS Analyse verläuft bis zu dem Schritt, wo die Immunzellen aus der Mittelphase des Dichtgradienten zweimal gewaschen wurden, genauso wie die FACS Analyse (siehe 2.2). Erst ab diesem Punkt wird ein anderes Protokoll verwendet.

Die aus der Mittelphase isolierten Immunzellen werden in 5 ml RPMI, welches 10% FKS enthält, aufgenommen. Das Zellkulturmedium wird zusätzlich mit Phorbol 12-Myristat 13- acetat (PMA, 50ng/ml) und mit Ionomycin (500ng/ml) versetzt. Die Zellen inkubieren nun für 4h bei 37°C. Anschließend wird noch Brefeldin (10 µg/ml) hinzugefügt und die Zellen inkubieren für weitere zwei Stunden bei 37°C. Nach dieser Zeit wird der Ansatz in ein 15 ml Falcon überführt und die Zellen bei 4°C und 1600rpm pelletiert und dann nochmals mit 10 ml HBSS gewaschen. Das Zellpellet wird nun, zur Detektion der Oberflächenrezeptoren der Zellen, in 100 µl *Blockingbuffer* + Brefeldin (10 µg/ml), in welchem die entsprechenden Antikörper im Verhältnis 1:200 gelöst sind, resuspendiert und für 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert.

Nach einmaligem Waschen mit 1x PBS + Brefeldin (10µg/ml) werden die Zellen für 20 min bei 4°C im Dunkeln in 200 µl 2% PFA fixiert. Der Ansatz wird wieder pelletiert und das Pellet wird in 1x PBS, welches 1% BSA und 0,5 % Saponin enthält, resuspendiert und für 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach nochmaligem Pelletieren werden die Zellen in 100 µl 1x PBS + Brefeldin (10µg/ml), in welchem die entsprechenden Antikörper zur Detektion der intrazellulären Zytokine im Verhältnis 1:200 gelöst sind, resuspendiert und für 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Abschließend werden die Zellen nochmal mit 1x PBS, welches 1% BSA und 0,5 % Saponin enthält, gewaschen und dann in 200 µl 1x PBS, welches 1% BSA enthält, resuspendiert und für 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, damit die Membranen sich wieder schließen können. Nun können die Zellen mittels BD FACSCanto™ II gemessen und mit Hilfe des Programms FlowJo ausgewertet werden.



### 2.2.4 RNS Isolation

Ein kleines Stück Leber (ca. 30 mg - 50 mg) wird in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß, in welchem 500 µl *peq Gold RNA pure*<sup>TM</sup> vorgelegt wurden, mit Hilfe eines Ultra Turrax (IKA Maschinenbau) homogenisiert. Das Homogenisat inkubiert nun für 10 Minuten bei Raumtemperatur, wobei es zwischendurch mehrmals kräftig geschüttelt werden muss. Nach dieser Zeit werden 100 µl Chloroform hinzu gegeben und das Gemisch wird wieder kräftig geschüttelt und inkubiert wieder für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend werden die Proben bei 4°C und 12000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Die nun entstandene wässrige Phase wird in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol, zur Fällung der RNS, versetzt. Die Proben inkubieren 10 Minuten auf Eis, wobei diese erneut mehrmals kräftig geschüttelt werden müssen. Jetzt wird das Gemisch wieder bei 4°C und 12000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Die RNS ist nun am Boden als gelartiges Pellet zu sehen. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und verworfen. Nach zweimaligem Waschen mit je 800 µl 70% Ethanol und Zentrifugation bei 4°C und 12000 rpm für 10 Minuten, wird das Pellet an der Luft getrocknet und abschließend in 20µl DEPC- Wasser aufgenommen und die Konzentration mit Hilfe eines Photometers ermittelt. Die Messung erfolgt bei einer Wellenlänge von 260 nm.

### 2.2.5 Umschreiben der RNS in cDNS

Zum Umschreiben der RNS in cDNS wird das *First Strand cDNA Synthesis Kit* der Firma Fermentas verwendet. Dafür wird im ersten Schritt 1µg RNS mit 1µl anchored-oligo-dT Primer versetzt und der Ansatz wird mit mit destilliertem Wasser auf 15 µl aufgefüllt. Nach der Denaturierung bei 70 °C für 10 min werden jeweils 7 µl des folgenden Mastermixes dazugegeben :

|         |                        |
|---------|------------------------|
| 4,45 µl | RT Puffer              |
| 2 µl    | Desoxynucleotide-Mix   |
| 0,5 µl  | RNAse-Inhibitor        |
| 0,05 µl | Reverse Transskriptase |

Die Transkriptionsreaktion erfolgt nun innerhalb von 30 min bei 55°C. Abschließend wird die Reaktion bei 85,5°C für 5 min inaktiviert und die umgeschriebenen Proben können dann bei -20°C, bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

### 2.2.6 Gen Expressionsanalyse

Um die Expression der Gene *Ccl3*, *Ccl5*, und *Kc* zu analysieren, wird eine so genannte *Real-Time* PCR durchgeführt. Dafür werden je 1,6µl der umgeschriebenen cDNS in die Vertiefungen einer *96-Well*-PCR-Platte pipetiert. Nun werden je 18,4µl des folgenden Mastermixes dazugegeben:

10 µl SYBR GreenER qPCR SuperMix  
 0,4 µl *forward* Primer (10µM)  
 0,4 µl *reverse* Primer (10µM)  
 7,6 µl DEPC- Wasser

Die hier verwendeten Primer wurden so zusammengestellt, dass diese alle bei einer Temperatur von 60 °C hybridisieren (*Annealing* Temperatur). Daher wird für die Expressionsanalysen folgendes Programm verwendet:

|                |           |      |
|----------------|-----------|------|
| Aktivierung    | 10:00 min | 95°C |
| Denaturierung  | 0:15 min  | 95°C |
| Hybridisierung | 1:00 min  | 60°C |

Die Schritte „Denaturierung“ und „Hybridisierung“ durchlaufen bis zum Ende der Reaktion jeweils abwechselnd 40 Zyklen.

Zur Quantifizierung der Expression der Zielgene wird auch noch in jeder verwendeten Probe die Expression von  $\beta$ -Aktin gemessen und mittels der Pfaffl - Methode die relative Induktion der Genexpression errechnet.

Um die Expression der Gene *Tgf- $\beta$* , *Timp-1*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Col1a1* und *IFN- $\gamma$*  zu analysieren werden Assays on Demand der Firma Applied Biosystems (<http://www.appliedbiosystems.com>) verwendet.

### 2.2.7 Protein Isolation

Ein kleines Stück Leber (ca. 50 mg) wird in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß, in welchem 1ml RIPA Puffer vorgelegt wurde, mittels eines Teflonhomogenisators zerkleinert. Das Homogenisat inkubiert nun für 30 Minuten auf Eis, wobei es ca. alle 5 Minuten mit Hilfe eines Vortexers vermischt wird. Nach der Inkubationszeit werden die Proben bei 4°C und 12000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand, in welchem sich die Proteine befinden, wird in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration wird wie folgt ermittelt: 2µl Probe werden mit 800µl Wasser verdünnt und mit 200µl Bio-Rad *Protein Assay* Reagenz versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wird mittels eines Photometers die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm ermittelt. Mit einer vorher erstellten Eichkurve können dann die Proteinkonzentration der Proben bestimmt werden.

### 2.2.8 ELISA

Im Folgenden wird nur die generelle Durchführung eines ELISAs beschrieben, da die Konzentrationen der verwendeten Antikörper für jeden ELISA unterschiedlich sind.

Zuerst wird der *Capture* Antikörper, wie im Datenblatt angegeben, verdünnt und anschließend werden je 100 µl pro verwendeter Vertiefung einer 96-Well-Mikrotiterplatte, überführt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wird der *Capture* Antikörper verworfen und die verwendeten Vertiefungen werden 3mal mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen. Dann wird die Platte durch Hinzugabe von je 300 µl *Reagent Diluent* für mindestens 1h bei Raumtemperatur geblockt. In der Zwischenzeit werden die Proben so mit *Reagent Diluent* verdünnt, dass man eine Konzentration von 1µg Gesamtprotein pro 200µl *Reagent Diluent* erhält. Ebenso werden die Standards so mit *Reagent Diluent* verdünnt, wie im Datenblatt angegeben. Nach 1h wird das *Reagent Diluent* verworfen und die Platte wieder 3mal mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen. Jetzt werden je 100 µl Probe oder Standard pro Vertiefung pipetiert. Die Platte wird mit einem Klebestreifen zugeklebt und

inkubiert nun für 2h bei Raumtemperatur. Nachdem die Platte abermals 3mal mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen wurde, werden pro Vertiefung 100 µl *Detection* Antikörper, in der wie im Datenblatt vorgegebenen Verdünnung, hinzugegeben. Die Platte wird wieder zugeklebt und inkubiert nochmals für 2h bei Raumtemperatur. Anschließend wird der *Detection* Antikörper verworfen und die Platte wieder 3mal mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen. Jetzt werden pro Vertiefung je 100 µl der Streptavidin-HRP Lösung, welche im Verhältnis 1:200 mit *Reagent Diluent* verdünnt wurde, hinzupipetiert. Die Platte wird wieder zugeklebt und inkubiert für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach dieser Zeit wird die Platte wieder 3mal mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen und es werden pro Vertiefung 100 µl der Substrat Lösung zugegeben. Abschließend wird die Reaktion nach einer wiederholten Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln, durch Hinzugabe von je 50 µl 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und die Absorbtion bei 450 nm gemessen. Anhand der Standards kann man nun eine Eichkurve erstellen und die Konzentration des gewünschten Proteins errechnen.

### **2.2.9 Western Blot**

Zu je 30 µg Protein werden 15 µl RIPA Puffer, 4µl NuPage LDS *Sample* Puffer und 1µl 1M Dithioreitol (DTT) hinzugegeben. Diese Lösung inkubiert für 10 min bei 72°C. In der Zwischenzeit wird die Gelkammer aufgebaut und mit 1x MOPS Laufpuffer befüllt. Die Geltaschen werden mit einer Spritze ausgespült und dann werden je 25 µl Probe pro Tasche und einmal 7 µl Standard auf das Gel geladen. Zur Auftrennung der Proteine wird nun für 1 Stunde eine Spannung von 160V an das Gel gelegt. Anschließend werden die Proteine für 2 Stunden bei einer Spannung von 40V auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, wobei die Kammer zusätzlich mit einem Eisblock gekühlt wird.

Nach Ablauf dieser Zeit wird die Membran zweimal mit TBS-T gewaschen und dann für 1 Stunde in TBS-T, welches mit 5% Milchpulver versetzt ist, bei Raumtemperatur geblockt.

Nun inkubiert die Membran in 10 ml TBS-T+ 2,5% Milchpulver, in welchem der primäre Antikörper in einem Verhältnis von 1:1000 verdünnt ist, über Nacht bei

4°C auf einem Schüttler. Am nächsten Tag wird die Membran 3mal für je 5 min mit TBS-T gewaschen und dann inkubiert diese für 1h bei Raumtemperatur in 10 ml TBS-T, in welchem der sekundäre Antikörper in einem Verhältnis von 1:1000 verdünnt ist. Die Membran wird nach Ablauf dieser Zeit wieder 3mal für je 5 min mit TBS-T gewaschen und dann mit 1ml ECL gleichmäßig beschichtet. Die nun einsetzende Chemolumineszenz Reaktion wird dann mittels des LAS reader 300 detektiert.

### **2.2.10 TUNEL-Färbung**

Zur Durchführung dieser Färbung wird das *in Situ Cell Death Detection Kit*® der Firma Roche verwendet.

Von den in Tissue Tec® eingebetteten Leberproben werden bei -20°C, mittels eines Kryotoms, 5 µm dünne Schnitte angefertigt. Diese werden dann für 20 min, bei Raumtemperatur, in 4% igem Paraformaldehyd, welches in PBS gelöst ist, fixiert und danach für 30 min in 1x PBS gewaschen. Nachdem die Schnitte für 10 min in 3% igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, in Methanol gelöst, inkubiert wurden, werden diese mittels 0,1 % TritonX in 0,1% Natriumcitrat, innerhalb von 2 min bei 4°C, permeabilisiert. Nun werden die Proben 3 mal für je 2 min mit 1x PBS gewaschen und dann mit folgendem Mix beschichtet:

0,5 µl Enzym  
45 µl Label solution  
4,5 µl TUNEL Dilution Buffer

Die so beschichteten Schnitte inkubieren nun über Nacht bei 4°C in einer feuchten, dunklen Kammer. Am nächsten Tag werden die Proben wieder 3 mal für je 2 min in 1x PBS gewaschen und abschließend mit Vecta Shield®, welches DAPI enthält, eingedeckelt. Die Ergebnisse werden dann zügig mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiomager Z1 der Firma Zeiss festgehalten.

### **2.2.11 Immunofluoreszenzfärbung der Ly6G positiven Zellen**

Von den in Tissue Tec® eingebetteten Leberproben werden bei -20°C, mittels eines Kryotoms, 5 µm dünne Schnitte angefertigt. Diese werden dann für 20 min, bei Raumtemperatur, in 4% igem Paraformaldehyd, welches in PBS gelöst ist, fixiert und danach 3mal für 3 min in PBS/azid gewaschen. In einem weiteren Schritt werden die Schnitte 5 min mit PBS/azid, welches 0,2% BSA enthält, geblockt. Der primäre Antikörper Mouse Ly-6G/G Gr-1 wird im Verhältnis 1:100 in PBS/azid, welches 1% Mausserum enthält, verdünnt und die Proben werden mit diesem Mix beschichtet. Nach einer Inkubation über Nacht, bei 4°C, werden die Schnitte wieder 3mal für je 3 min in PBS/azid gewaschen. Nun werden die Proben wieder 5 min mit PBS/azid, welches 0,2% BSA enthält, geblockt. Der sekundär Antikörper Alexa Fluor® 488 rabbit anti rat wird im Verhältnis 1:300 in PBS/azid, welches 1% Mausserum enthält, verdünnt und die Schnitte werden mit diesem Mix beschichtet und inkubieren dann für 45 min bei 4°C im Dunkeln. Nach Ablauf dieser Zeit werden die Schnitte wieder 3 mal für je 3 min in PBS/azid gewaschen. Abschließend werden die Proben kurz mit destilliertem Wasser gewaschen, dann mit Vecta Shield®, welches DAPI enthält, eingedeckelt und die Ergebnisse zügig mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiolmager Z1 der Firma Zeiss festgehalten.

### **2.2.12 H&E Färbung**

Von denen in Paraffin eingebettet Leberproben werden 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese inkubieren in einem ersten Schritt für 30 min bei 60°C. Nun werden diese 3 mal jeweils für 5 min in Xylol gelegt. Anschließend durchlaufen die Schnitte die folgende absteigende Alkoholreihe: 2 mal für je 5 min in 100% Ethanol, 2 mal für je 5 min in 96 % Ethanol und einmal für 5 min in 70 % Ethanol und zum Abschluss werden die Proben für 5 min in destilliertes Wasser gelegt. Danach werden die Schnitte für 10 min in 0,1% Mayers Hematoxylin Lösung gefärbt. Nachdem die Proben vorsichtig für 5 min mit fließendem Wasser gewaschen wurden, werden diese für 5 min in 95 % Ethanol, welches 1% Eosin enthält, inkubiert. Nach nochmaligem, sehr kurzem Waschen mit Leitungswasser durchlaufen die Schnitte folgende aufsteigende Alkoholreihe: 10

Sekunden in 70 % Ethanol, 2 min 96 % Ethanol und 2 mal für je 5 min in 100% Ethanol. Abschließend inkubieren die Proben 3 mal für je 5 min in Xylol und werden dann in Kunstharz eingedeckelt.

### **2.2.13 Naphtol-AS-D-Chloracetatesterase-Färbung**

Zur Durchführung dieser Färbung wird das Naphtol-AS-D-Chloracetatesterase-Kit der Firma Sigma-Aldrich verwendet. Von denen in Paraffin eingebettet Leberproben werden 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese werden dann für 30 Sekunden bei Raumtemperatur mittels einer Zirat-Aceton-Formaldehyd-Lösung fixiert. Nachdem die Schnitte für 1 min mit destilliertem Wasser gewaschen wurden, inkubieren diese nun für 15 min bei 37°C in der frisch angesetzten Naphtol-AS-D-Chloracetatesterase-Lösung. Nun werden die Proben wieder für mindestens 2 min mit destilliertem Wasser gewaschen und dann für 2 min mit der Hematoxylin-Lösung Gill No.3 gegengefärbt. Nach abschließendem Waschen mit Leitungswasser werden die Schnitte mit Immo-Mount™ eingedeckelt.

### **2.2.14 Sirius-Rot Färbung**

Von denen in Paraffin eingebettet Leberproben werden 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese inkubieren in einem ersten Schritt für 15 min bei 65°C. Nun werden diese 3 mal jeweils für 5 min in Xylol gelegt. Anschließend durchlaufen die Schnitte die folgende absteigende Alkoholreihe: 2 mal für je 5 min in 100% Ethanol, 2 mal für je 5 min in 96 % Ethanol und einmal für 5 min in 70 % Ethanol und zum Abschluss werden die Proben für 5 min in deionisiertes Wasser gelegt. Nun inkubieren die Schnitte für 45 min in der Sirius Rot Färbelösung. Dann werden diese 2 mal für je 15 Sekunden mit 0,5 % Essigwasser gewaschen und anschließend für 2 min in 96 % Ethanol und danach 2 mal für je 5 min in 100% Ethanol gewaschen. Abschließend inkubieren die Proben 3mal für je 5 min in Xylol und werden dann in Kunstharz eingedeckelt.

### **2.2.15 Messung des Hydroxyprolinegehaltes**

Es werden 30-50 mg Leber in ein 15 ml Falcon überführt und anschließend wird soviel 6N HCl dazugegeben, dass eine Konzentration von 50 mg Leber / 1ml HCl erhalten wird. Die Leberstücke werden dann homogenisiert und für 16h bei 110°C inkubiert. Nach dieser Zeit wird das Homogenat filtriert. Von diesem Filtrat werden 15 µl in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß gegeben und mit 15 µl Methanol versetzt, gevortext und unter Stickstoff eingeeengt. Das nun entstandene Kristallat wird dann in 50 µl 50 % Isopropanol gelöst. Zur gleichen Zeit wird eine Standardreihe mit reinem Hydroxyprolin erstellt, welche die nun folgenden Schritte mit durchläuft.

Zu je 50 µl Probe bzw. 50 µl Standard werden 100 µl einer 0,6 % igen Chloramin-T Lösung hinzupipetiert, gevortext und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun werden 100 µl, frisch zubereitete, Ehrlich's Reagenz- Lösung hinzugegeben und nach abschließender Inkubation von 45 min bei 50°C, wird die Absorbtion bei 570 nm mittels eines Photometers gemessen. Aus den Werten der Standards kann nun eine Eichkurve erstellt werden und mittels dieser der Hydroxyprolinegehalt der Proben errechnet werden.

### **2.2.16 Zellkultur**

Zur Durchführung der *in vitro* Experimente werden die humane Sternzelllinie LX-2 und die murine Sternzelllinie GRX verwendet.

Die humanen Sternzellen werden in DMEM *high Glucose* Medium, welches 2% FKS enthält, kultiviert. Die murinen Sternzellen werden in DMEM *high Glucose* Medium, welches 10% FKS enthält, kultiviert. Zur Vermeidung von Kontaminationen enthalten beide Medien jeweils 1 % eines Penicilin/Streptomycin Mixes. Beide Zelllinien werden in einem Brutschrank bei 37°C und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5% gehalten.

Zur Stimulation der Zellen, werden diese in so genanntem Hungermedium für 24 h gehalten, d.h. im gleichen Medium wie oben beschrieben, welches aber nur 0,5% FKS enthält. Am nächsten Tag wird das Medium mit frischem Hungermedium ersetzt und die zu untersuchende Substanz wird, wie im



Ergebnissteil beschrieben, hinzu gegeben. Dieser Ansatz inkubiert dann für 24h bzw. 48h (s.3.2.4 bzw. 3.3.2) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank.

Nach Ablauf der angegebenen Zeiträume werden die jeweiligen Überstände zur weiteren Analyse in Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Die Zellen werden dann zur Proteinisolierung mit 1ml RIPA Puffer versetzt, mit einem Zellschaber abgekratzt und dann weiter behandelt wie oben (s. 2.2.7) beschrieben. Zur Isolierung der RNS wird 1 ml Peq Gold Trifast zu den Zellen gegeben und anschließend ebenso wie oben (s.2.2.4) beschrieben fortgeführt.

### **2.2.17 Ermittlung der Migration**

Zur Bestimmung der Migration der Zellen wird eine modifizierte Boyden-Kammer verwendet.

Dafür wird in die untere Kammer 250µl Medium gefüllt, welches rekombinantes murines CXCL4 in einer Konzentration von 200ng/ml bzw. 2000ng/ml enthält. In die obere Kammer werden  $2 \times 10^5$  Zellen gefüllt. Beide Kammern werden nun zusammen geschraubt, wobei diese durch eine Membran getrennt sind. Dieser Ansatz inkubiert dann für 4h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Nach Ablauf dieser Zeit wird die Membran vorsichtig mit einer Pinzette entnommen. Die Filteroberseite wird abgewischt und dann mittels der Hemacolor®-Schnellfärbung gefärbt. Die Filter inkubieren jeweils für 1 min nacheinander in der Fixierlösung, in der roten Färbelösung und in der blauen Färbelösung. Abschließend werden die Filter mit Leitungswasser gewaschen und mit der Unterseite nach oben auf einen Objektträger gelegt. Die gewanderten Zellen können nun mit Hilfe eines Mikroskops ausgezählt werden.

### **2.2.18 Statistik**

Zur statistischen Auswertung der erhaltenen Daten wurde das Programm GraphPad Prism verwendet. Alle in dieser Arbeit gezeigten Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler dargestellt. Mit Hilfe des Student's Tests wurde die Signifikanz errechnet, wobei P-Werte welche kleiner als 0,05 waren, als statistisch signifikant erachtet wurden.

### **2.2.19 Kooperationen**

Die Ermittlung der Proliferationsrate der GRX Zelllinie, durch die Aufnahme von <sup>3</sup>H- Thymidin, und die Stimulation der GRX Zellen mit TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  und PDGF wurde in Kooperation mit der Abteilung für klinische Chemie und Pathobiochemie des UK Aachens unter der Aufsicht von Prof. R. Weiskirchen durchgeführt.

Die immunhistochemische Färbung der humanen Biopsieproben, hinsichtlich des Proteins CXCL9, wurde in Kooperation mit der Abteilung Innere Medizin I des UK Regensburg unter der Aufsicht von Prof. C. Hellerbrand durchgeführt.

Die immunhistochemische Färbung der humanen Biopsieproben, hinsichtlich der Thrombozyten, wurde in Kooperation mit dem Institut für Pathologie des UK Aachens unter der Aufsicht von Prof. N. Gassler durchgeführt.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Thrombozyten wurden in der elektronen-mikroskopischen Abteilung des UK Aachens von Dr. J. Bornemann durchgeführt.

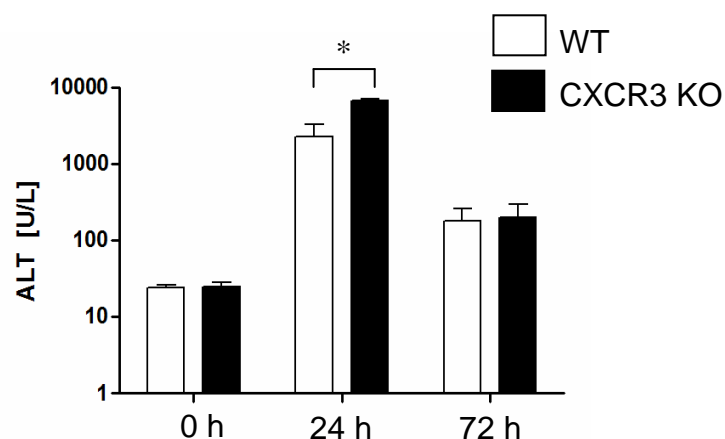
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Akute Leberschädigung

Um den akuten Leberschaden zu induzieren, wurden den Wildtyp- und den CXCR3<sup>-/-</sup>-Mäusen intraperitoneal Tetrachlorkohlenstoff, mit einer Dosis von 0,8 mg/kg, injiziert.

#### 3.1.1 Ermittlung des Leberschadens

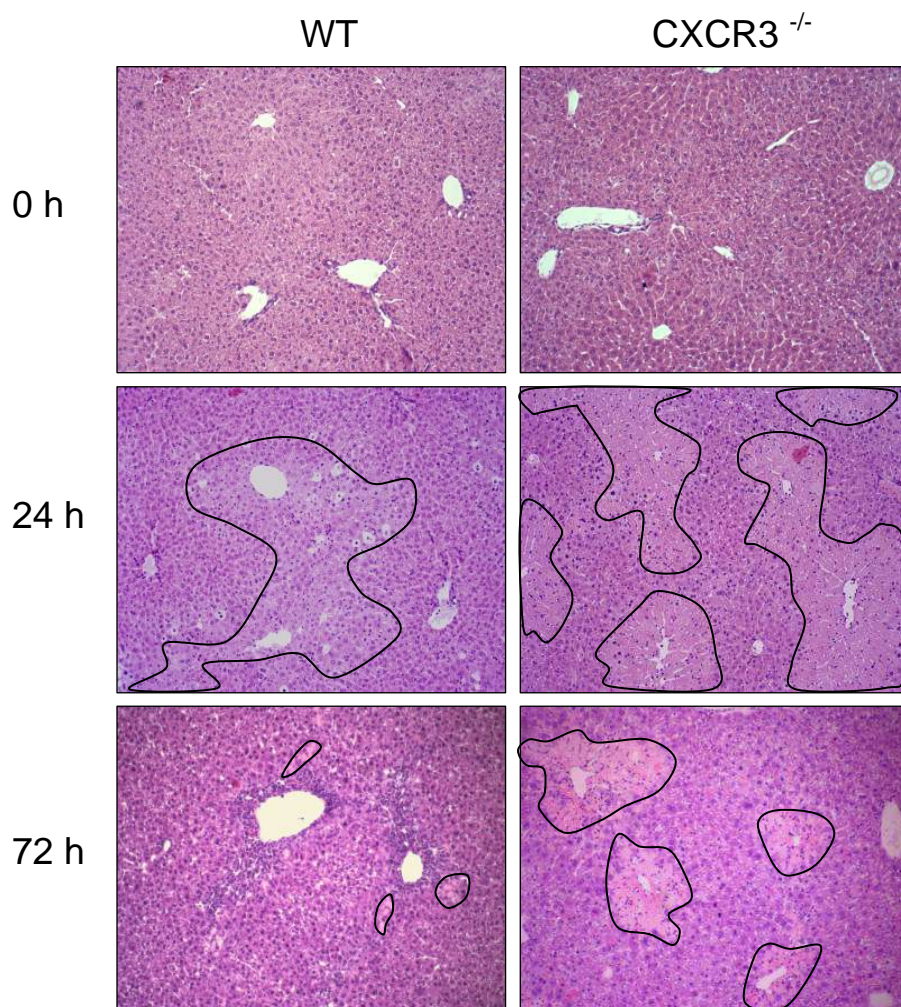
Wie zu erwarten führte die CCl<sub>4</sub> Behandlung zu einem massiven Leberschaden, welcher durch die stark erhöhten Serumwerte für Alanin-Aminotransferase ALT (Abb. 4) erfasst wurde. 24 Stunden nach der Injektion stiegen die Werte bei den Wildtypmäusen auf 2287,5 U/L ± 2021,52 und bei den CXCR3<sup>-/-</sup> Mäusen auf einen signifikant höheren Wert von 6689,67 U/L ± 513,46. Die stark erhöhten Werte der Serumtransaminasen fielen aber nach 72h wieder auf 180,25 U/L ± 155,05 bei den Wildtypen und auf 248,33 U/L ± 192,00 bei den CXCR3<sup>-/-</sup> Tieren.



**Abb.4:** Logarithmische Darstellung der Serumtransaminasen (ALT) vor, 24h und 72h nach der intraperitonealen Injektion von Tetrachlorkohlenstoff in Wildtypmäusen (WT, weiße Balken) und in CXCR3<sup>-/-</sup> Mäusen (CXCR3 KO, schwarze Balken) , \* =  $P < 0,05$

Da die Serumtransaminasen nur ein diagnostischer Hinweis auf eine Leberschädigung sind, wurde anschließend eine Hämalaun-Eosin-Färbung

durchgeführt. Mit dieser Färbung kann man den histologischen Schaden in der Leber beurteilen. Wie in Abbildung 5 zu erkennen ist, weisen weder die unbehandelten Wildtypen noch die unbehandelten CXCR3<sup>-/-</sup> Tiere einen histologischen Leberschaden auf. Der Schaden ist aber 24h nach der CCl<sub>4</sub>-Injektion enorm. Man erkennt grosse nekrotische Areale bei beiden Gruppen, welche bei den *knockout* Mäusen stärker ausgebildet sind als bei den Wildtypen.



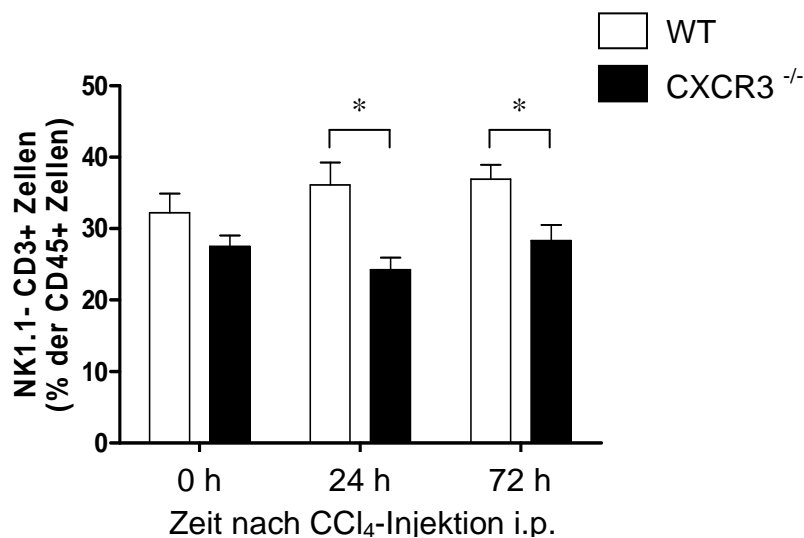
**Abb.5:** Exemplarische Hämalaun-Eosin-Färbungen von in Parafin eingebetteten Schnitten der Leber von Unbehandelten (oben), 24h (mitte) und 72h (unten) nach der CCl<sub>4</sub>-Behandlung. Die geschädigten Areale sind schwarz umrandet. Vergrößerung: 100 X

Während sich die Wildtypen 72h nach der CCl<sub>4</sub>-Injektion fast wieder komplett

regeneriert hatten, waren bei den CXCR3<sup>-/-</sup> Tieren immer noch histologische Schäden zu erkennen. Somit spiegeln die Serumtransaminasen den mittels der Histologie belegten Schaden sehr gut wider.

### 3.1.2 Durchflusszytometrische Analyse

Mittels der histologischen Untersuchungen und den Serumtransaminasen wurde gezeigt, dass die Injektion von CCl<sub>4</sub> in den CXCR3<sup>-/-</sup> Tieren zu einem verstärkten Leberschaden führt. Da auch Immunzellen diesen Rezeptor tragen, wurde im nächsten Schritt mittels Durchflusszytometrie (FACS= fluorescence activated cell sorting) die Infiltration von Immunzellen in die Leber untersucht. In Abbildung 6 ist die Infiltration von T-Zellen vor, 24h und 72h nach der Behandlung mit CCl<sub>4</sub> dargestellt.



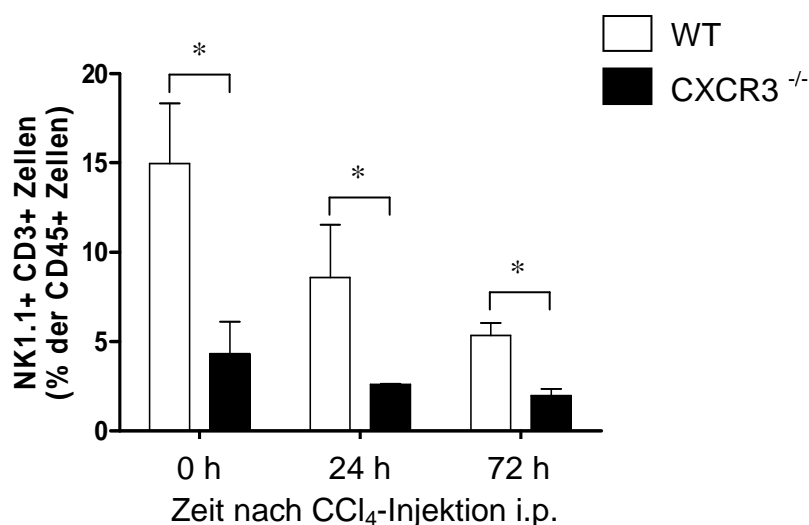
**Abb.6:** Intrahepatische Infiltration von T-Zellen (NK1.1- CD3+) zu den angegebenen Zeitpunkten nach der CCl<sub>4</sub> Injektion in Wildtypmäusen (WT, weiße Balken) und in CXCR3<sup>-/-</sup> Mäusen (CXCR3 KO, schwarze Balken), \* =  $P < 0,05$

Man kann klar erkennen, dass es innerhalb der Wildtypgruppe zu keinem Zeitpunkt zu einer statistisch signifikanten Änderung der intrahepatischen CD3<sup>+</sup> T-Zell Population kommt. Allenfalls ist eine leichte Steigerung der CD3<sup>+</sup> T-Zellen zu erkennen. Ähnliche Ergebnisse kann man innerhalb der CXCR3<sup>-/-</sup>

Gruppe erkennen. Auch hier kommt es zu keinem Zeitpunkt zu einer statistisch signifikanten Änderung der intrahepatischen CD3<sup>+</sup> T-Zell Population.

Aber 24h nach der Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff weisen die CXCR3<sup>-/-</sup>, im Vergleich zu den Wildtypen, eine signifikant geringere Infiltration von CD3<sup>+</sup> T-Zellen in die Leber auf (24,21% ± 1,78 vs. 36,11% ± 3,16). Dieser signifikante Unterschied war auch noch nach 72h vorhanden (28,33% ± 2,17 vs. 36,93% ± 2,00)

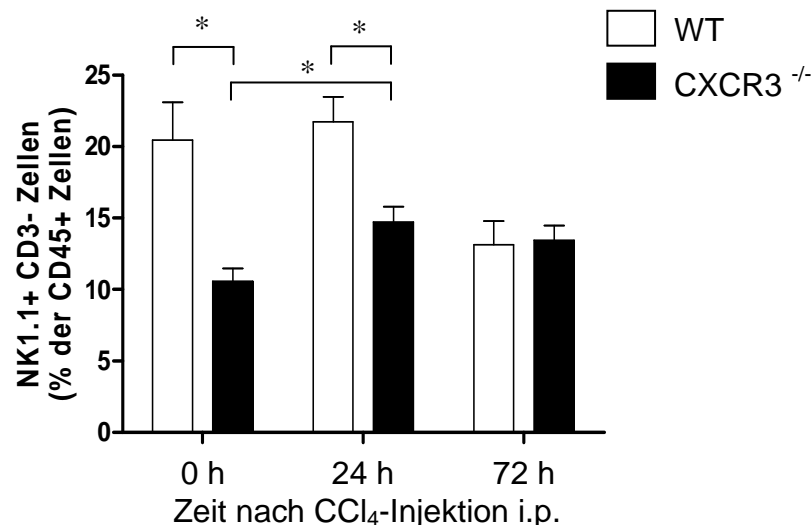
In einem weiteren Schritt wurde die Infiltration von NKT-Zellen in die geschädigte Leber untersucht. Diese Ergebnisse sind in Abb. 7 dargestellt.



**Abb.7:** Intrahepatische Infiltration von NKT-Zellen (NK1.1+ CD3+) zu den angegebenen Zeitpunkten nach der CCl<sub>4</sub> Injektion in Wildtypmäusen (WT, weiße Balken) und in CXCR3<sup>-/-</sup> Mäusen (CXCR3 KO, schwarze Balken), \* =  $P < 0,05$

Auffällig bei dieser Zellpopulation ist, dass schon unbehandelte CXCR3<sup>-/-</sup> - Tiere eine signifikant geringere Menge an intrahepatischen NKT-Zellen aufweisen (4,32% ± 1,79 vs. 14,96% ± 3,37). Dieser Unterschied bleibt auch nach 24h (2,61% ± 0,02 vs. 8,59% ± 2,95) bzw. 72h (1,99% ± 0,37 vs. 5,35% ± 0,69) nach der CCl<sub>4</sub>-Injektion erhalten. Des Weiteren verringert sich die Anzahl der NKT-Zellen über den gesamten Zeitraum des Experimentes in beiden Gruppen.

Zuletzt wurde mittels der FACS-Analyse die intrahepatische Infiltration von NK-Zellen gemessen, welche in Abb. 8 dargestellt ist.



**Abb.8:** Intrahepatische Infiltration von NK-Zellen (NK1.1+ CD3-) zu den angegebenen Zeitpunkten nach der CCl<sub>4</sub> Injektion in Wildtypmäusen (WT, weiße Balken) und in CXCR3<sup>-/-</sup> Mäusen (CXCR3 KO, schwarze Balken), \* =  $P < 0,05$

Ein weiteres Mal wiesen die CXCR3<sup>-/-</sup>-Tiere, im Vergleich zu den Wildtypen, schon vor der Behandlung eine signifikant geringere Immunzellpopulation auf. In diesem Fall besaßen die *knockout* Tiere nur halb so viele NK-Zellen in der Leber, wie die Wildtypiere (10,6% ± 0,86 vs. 20,46% ± 2,62). Während die Kontrolltiere 24h nach der CCl<sub>4</sub>-Behandlung keine Erhöhung der intrahepatischen NK-Zellpopulation zeigten (21,72% ± 1,76), stieg diese aber in den CXCR3<sup>-/-</sup>-Tieren, obwohl nur leicht, auf 14,71% ± 1,1 signifikant an. Diese erhöhte Anzahl an NK-Zellen blieb auch noch 72h nach der Behandlung (13,44% ± 1,05) erhalten, während sich bei den Wildtypen die intrahepatische NK-Zellpopulation mit einem Wert von 13,13% ± 1,65 fast halbierte.

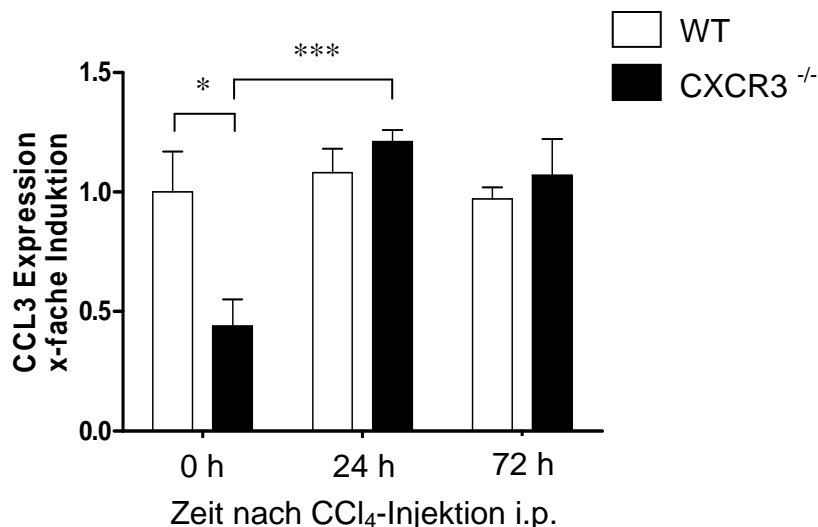
Da schon einige Studien die Rolle von T-Zellen und NKT-Zellen [40, 43] im Rahmen von akuter Leberschädigung genauer beschrieben haben, wird im folgendem näher auf die Rolle der NK-Zellen eingegangen.

### 3.1.3 Alternative Wege der NK-Zellrekrutierung

Wie bereits erwähnt, ist der Chemokinrezeptor CXCR3 essentiell für die Rekrutierung von Immunzellen. Überraschenderweise konnten aber die CXCR3<sup>-/-</sup>-Mäuse, nach der Induktion des Leberschadens, NK-Zellen

rekrutieren (Abb.8). Somit mussten diese über einen alternativen Weg in die geschädigte Leber gelangen. Da auf NK-Zellen auch die Rezeptoren CCR1 und CCR5 [28, 104] exprimiert werden, wurde zuerst eine RT-PCR (*realtime polymerase chain reaction*) durchgeführt. Dafür wurden die Liganden CCL3 (MIP-1  $\alpha$ ) und CCL5 (Rantes) ausgewählt, da diese an beiden Rezeptoren binden können [65].

In Abb. 9 kann man deutlich erkennen, dass es innerhalb der Wildtypgruppe zu keinem der gemessenen Zeitpunkte, zu einer Änderung der intrahepatischen CCL3-Expression kommt. Die unbehandelten CXCR3<sup>-/-</sup> Tiere zeigen, im Vergleich zu den unbehandelten Wildtyptieren, eine signifikant reduzierte CCL3-Expression ( $0,44 \pm 0,11$  vs.  $1,00 \pm 0,17$ ), welche sich 24h nach der Induktion des Leberschadens auf  $1,21 \pm 0,05$  mehr als verdoppelt und auch nach 72h mit einem Wert von  $1,07 \pm 0,15$  immer noch auf diesem hohen Niveau bleibt.

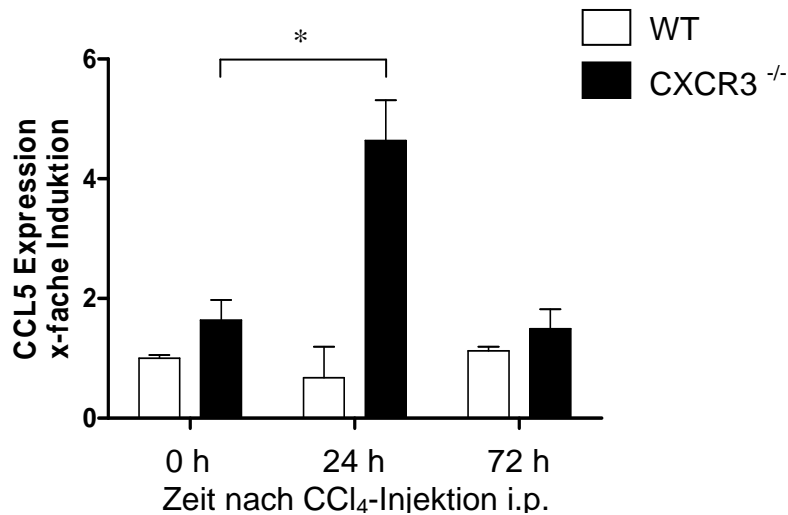


**Abb.9:** Durch RT-PCR ermittelte intrahepatische CCL3-Expression zu den angegebenen Zeitpunkten nach der CCl<sub>4</sub> Injektion in Wildtypmäusen (WT, weiße Balken) und in CXCR3<sup>-/-</sup> Mäusen (CXCR3 KO, schwarze Balken), \* =  $P < 0,05$ , \*\*\* =  $P < 0,001$

Ähnliche Resultate wurden bei der Ermittlung der intrahepatischen CCL5-Expression erzielt, welche in Abb. 10 dargestellt sind. Auch hier zeigten die Kontrolltiere zu keinem gemessenen Zeitpunkt eine statistisch relevante Veränderung in der CCL5-Expression. Vor der Induktion des Leberschadens



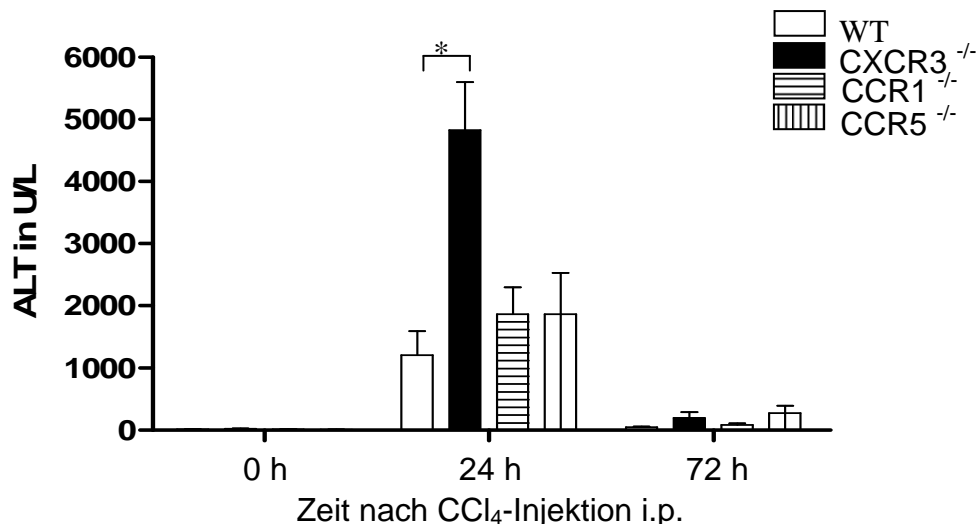
hatten die CXCR3<sup>-/-</sup>-Tiere eine leicht erhöhte, jedoch nicht signifikante, CCL5-Expression, im Vergleich zu den Wildtypkontrollen ( $1,64 \pm 0,34$  vs.  $1,00 \pm 0,06$ ). In den CXCR3 *knockout* Tieren verdreifachte sich die CCL5-Expression, auf  $4,64 \pm 0,67$ , 24h nach der Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff. Nach 72h fiel die CCL5-Expression wieder auf den Ausgangswert zurück ( $1,49 \pm 0,33$ ).



**Abb.10:** Durch RT-PCR ermittelte intrahepatische CCL5-Expression zu den angegebenen Zeitpunkten nach der CCl<sub>4</sub> Injektion in Wildtypmäusen (WT, weiße Balken) und in CXCR3<sup>-/-</sup> Mäusen (CXCR3 KO, schwarze Balken), \* =  $P < 0,05$

Basierend auf den PCR-Daten wurden anschließend auch mit CCR1 und CCR5 *knockout* Tieren die Experimente wiederholt, d.h. neben Wildtypkontrolltieren und CXCR3<sup>-/-</sup> wurde auch CCR1<sup>-/-</sup> und CCR5<sup>-/-</sup> Tieren intraperitoneal Tetrachlorkohlenstoff, mit einer Dosis von 0,8mg/kg, injiziert.

Vor der Behandlung, 24h und 72h danach wurden die Serumtransaminasen und die Infiltration von NK-Zellen in die Leber gemessen. In Abb. 11 kann man bei allen Versuchsgruppen, 24h nach der CCl<sub>4</sub> – Injektion, eine deutliche Erhöhung der Serumtransaminasen erkennen. Wieder zeigen die CXCR3<sup>-/-</sup> Tiere signifikant höhere Werte, als die Wildtypkontrollen ( $4827 \text{ U/L} \pm 768,5$  vs.  $1206 \text{ U/L} \pm 3,86$ ). Die CCR1<sup>-/-</sup> und CCR5<sup>-/-</sup> Tiere hingegen haben zu diesem Zeitpunkt ähnliche hohe Werte wie die Wildtyptiere. Nach 72h sind die Serumtransaminasen in allen 4 verwendeten Tierstämmen annähernd wieder auf die Ausgangswerte gesunken.



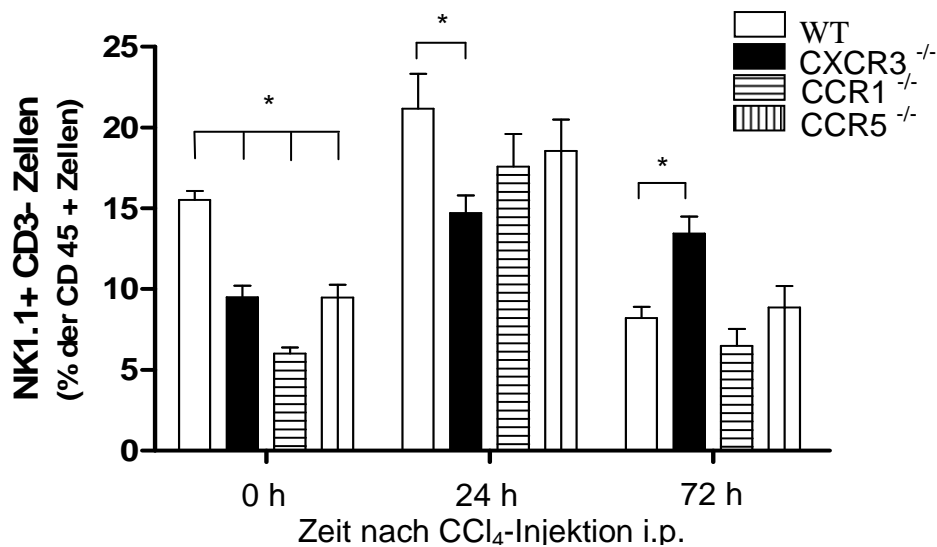
**Abb.11** Darstellung der Serumtransaminasen (ALT) vor, 24h und 72h nach der intraperitonealen Injektion von Tetrachlorkohlenstoff in Wildtypmäusen (weiße Balken), in CXCR3<sup>-/-</sup> Mäusen (schwarze Balken), CCR1<sup>-/-</sup> Mäusen (quer gestreifte Balken) und CCR5<sup>-/-</sup> Mäusen (längs gestreifte Balken) , \* =  $P < 0,05$

Die genauen Werte der Serumtransaminasen sind zur besseren Übersicht in folgender Tabelle dargestellt.

| Zeit nach CCl <sub>4</sub> -Injektion i.p. | Wildtyptiere      | CXCR3 <sup>-/-</sup> Tiere | CCR1 <sup>-/-</sup> Tiere | CCR5 <sup>-/-</sup> Tiere |
|--|-------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0 h  | 13,70 U/L ± 1,49  | 24,75 U/L ± 3,54           | 14,0 U/L ± 1,46           | 9,33 U/L ± 0,92           |
| 24 h                                       | 1206,00 U/L ± 386 | 4827,00 U/L ± 768,5        | 1868,00 U/L ± 431,40      | 1867,00 U/L ± 664,10      |
| 72 h                                       | 45,80 U/L ± 11,77 | 197,50 U/L ± 96,00         | 85,20 U/L ± 26,29         | 277,80 U/L ± 115,70       |

**Tab.1:** Darstellung der exakten Werte der Serumtransaminasen aller 4 Versuchstiergruppen zu den angegebenen Zeitpunkten nach der CCl<sub>4</sub> Behandlung

Mittels der FACS Analyse konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass die drei hier verwendeten *knockout* Mausstämme im Vergleich zu den Wildtypkontrollen, schon vor der CCl<sub>4</sub>- Behandlung signifikant weniger NK-Zellen in ihren Lebern hatten, wie man der Abb. 12 entnehmen kann. Zu diesem Zeitpunkt hatten die CCR1<sup>-/-</sup> Tiere sogar eine noch kleinere intrahepatische NK-Zellpopulation als die CXCR3<sup>-/-</sup> und CCR5<sup>-/-</sup> Tiere.



**Abb.12:** Intrahepatische Infiltration von NK-Zellen (NK1.1+ CD3-) zu den angegebenen Zeitpunkten nach der CCl<sub>4</sub> Injektion in Wildtypmäusen (weiße Balken), in CXCR3<sup>-/-</sup> Mäusen (schwarze Balken), CCR1<sup>-/-</sup> Mäusen (quer gestreifte Balken) und CCR5<sup>-/-</sup> Mäusen (längs gestreifte Balken), \* =  $P < 0,05$

Der große Unterschied innerhalb dieser Immunzellpopulation war aber nach 24h nur noch in den CXCR3<sup>-/-</sup> evident. Die CCR1<sup>-/-</sup> und CCR5<sup>-/-</sup> Tiere konnten 24h nach der CCl<sub>4</sub>-Injektion, in einem ähnlich Ausmaß wie die Wildtypen, NK-Zellen in die geschädigten Lebern rekrutieren. Nach 72h verringerte sich die intrahepatische NK-Zellpopulation in den Wildtypen, CCR1<sup>-/-</sup> und CCR5<sup>-/-</sup> Tieren um die Hälfte, wohingegen bei den CXCR3<sup>-/-</sup> Tieren die Anzahl der NK-Zellen auf dem gleich hohen Niveau, wie bei dem 24h Zeitpunkt blieben. Die genauen Werte der intrahepatischen NK-Zellen sind zur besseren Übersicht in folgender Tabelle dargestellt.

| Zeit nach CCl <sub>4</sub> -Injektion i.p. | Wildtyptiere  | CXCR3 <sup>-/-</sup> Tiere | CCR1 <sup>-/-</sup> Tiere | CCR5 <sup>-/-</sup> Tiere |
|--|---------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0 h  | 15,53% ± 0,56 | 9,52% ± 0,70               | 6,02% ± 0,7               | 9,48% ± 0,77              |
| 24 h                                       | 21,18% ± 2,16 | 14,71% ± 1,10              | 17,59% ± 2,02             | 18,58% ± 1,94             |
| 72 h                                       | 8,21% ± 0,70  | 13,44% ± 1,05              | 6,49% ± 1,05              | 8,87% ± 1,32              |

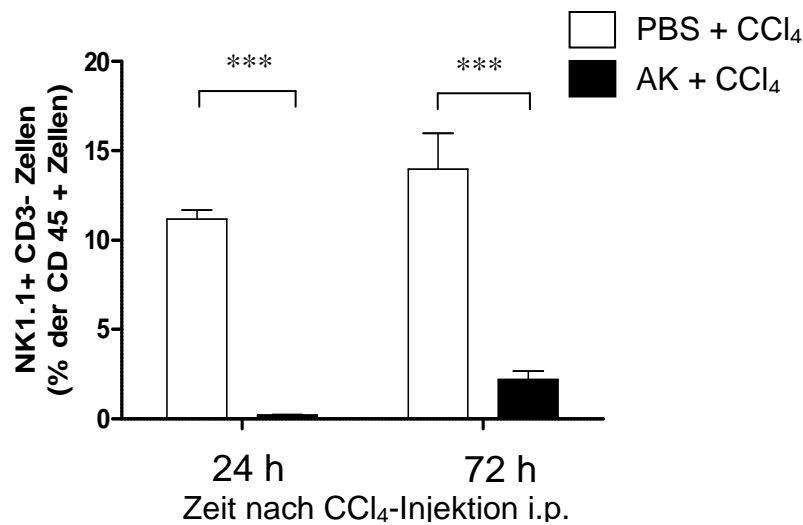
**Tab.2:** Darstellung der exakten Werte der mittels FACS Analyse ermittelten intrahepatischen NK-Zellen aller 4 Versuchstiergruppen zu den angegebenen Zeitpunkten nach der CCl<sub>4</sub> Behandlung.

### 3.1.4 Das Fehlen von NK-Zellen verstärkt den Leberschaden

Um die Rolle der NK-Zellen, bei der akuten CCl<sub>4</sub>-induzierten Leberschädigung genauer zu charakterisieren, wurden im folgenden Experiment die NK-Zellen in Wildtypmäusen, vor der Induktion des Leberschadens, mittels eines Antikörpers depletiert.

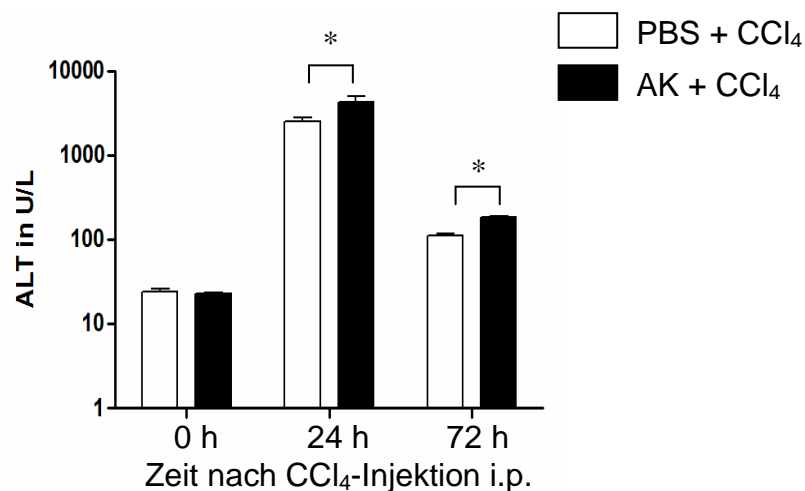
Da die Serumtransaminasen ALT (Abb.14) und die Histologie (Abb.15) keinen Hinweis auf eine Leberschädigung, vor der Behandlung mit CCl<sub>4</sub>, liefern, wurde in den folgenden Experimenten der Fokus auf die Zeitpunkte nach der CCl<sub>4</sub>-Injektion (24h und 72h) gelegt.

Die durchflusszytometrische Analyse in Abb. 13 zeigt, dass die Eliminierung der NK-Zellen über den gesamten Zeitraum des Experimentes erfolgreich war. 24 Stunden nach der CCl<sub>4</sub>-Injektion hatten die Tiere, welche mit dem Antikörper anti ASIALO GM1 behandelt wurden, mit 0,22% ± 0,04 fast gar keine NK-Zellen in der Leber. Zwar hatte sich die intrahepatische NK-Zellpopulation nach 72h wieder etwas regeneriert, aber es waren immer noch signifikant weniger NK-Zellen vorhanden, im Vergleich zu der Gruppe, welche nur mit CCl<sub>4</sub> behandelt wurde (2,22% ± 0,45 vs. 13,97% ± 2,03).



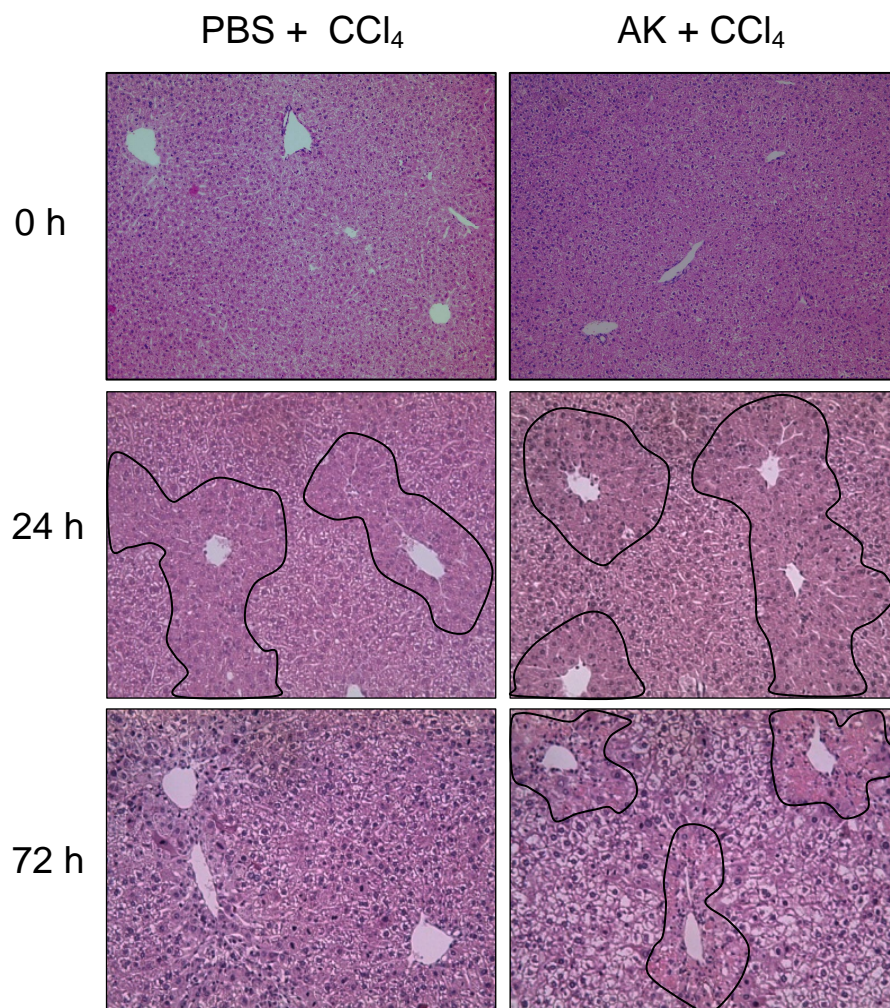
**Abb.13:** Intrahepatische Infiltration von NK-Zellen (NK1.1+ CD3-) zu den angegebenen Zeitpunkten nach der CCl<sub>4</sub>-Injektion in Wildtypmäusen. Die Tiere erhielten entweder CCl<sub>4</sub> und PBS (PBS + CCl<sub>4</sub>, weiße Balken) oder anti ASIALO GM1 Antikörper und CCl<sub>4</sub> (AK + CCl<sub>4</sub>, schwarze Balken), \*\*\* =  $P < 0,001$

Wie bereits erwähnt, führte die Injektion des Antikörpers vor der CCl<sub>4</sub>-Behandlung zu keiner Änderung der Serumtransaminase ALT und auch die unbehandelten Tiere zeigten keine Veränderung (Abb.14).



**Abb.14:** Logarithmische Darstellung der Serumtransaminasen (ALT) vor, 24h und 72h nach der intraperitonealen Injektion von Tetrachlorkohlenstoff in Wildtypmäusen. Die Tiere erhielten entweder CCl<sub>4</sub> und PBS (PBS + CCl<sub>4</sub>, weiße Balken) oder anti ASIALO GM1 Antikörper und CCl<sub>4</sub> (AK + CCl<sub>4</sub>, schwarze Balken), \* =  $P < 0,05$

Die Injektion von  $\text{CCl}_4$  verursachte in eine drastische Erhöhung der Leberwerte (ALT) in beiden Gruppen nach 24h. Die Tieren, bei welchen die NK-Zellen depletiert waren, wiesen signifikant höhere Werte auf als die Tiere, welche nur mit Tetrachlorkohlenstoff behandelt wurden ( $4216,67 \text{ U/L} \pm 1311,54$  vs.  $2516 \text{ U/L} \pm 595,05$ ). Nach 72 Stunden fielen die Werte in beiden Gruppen wieder stark ab, wobei die mit dem Antikörper anti ASIALO GM1 behandelten Tiere, immer noch signifikant höhere ALT-Werte aufwiesen ( $184,33 \text{ U/L} \pm 5,86$  vs.  $112 \text{ U/L} \pm 9,89$ ). Dieser Laborbefund wurde auch durch die Histologie bestätigt.



**Abb.15:** Exemplarische Hämalaun-Eosin-Färbung von in Parafin eingebetteten Schnitten der Leber von Unbehandelten (oben), 24h (mitte) und 72h (unten) nach der  $\text{CCl}_4$ - Behandlung. Die geschädigten Areale sind schwarz umrandet. Links sind die Färbungen von den Tieren denen PBS und  $\text{CCl}_4$  injiziert wurde und rechts die von den Tieren, welchen anti ASIALO GM1 und  $\text{CCl}_4$  injiziert wurde. Vergrößerung: 100 X

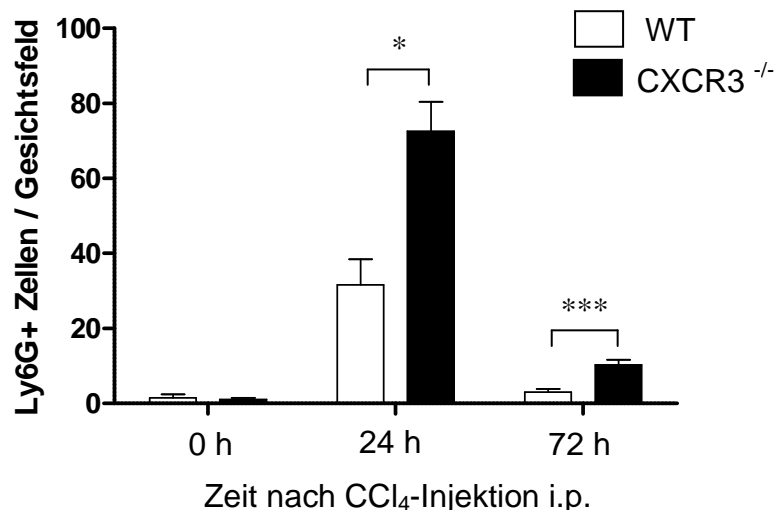
Die Hämalaun-Eosin-Färbung (Abb.15) enthüllte, dass die Tiere, deren NK-Zellen mittels Antikörpers eliminiert wurden, einen ähnlichen Phänotyp aufwiesen, wie die CXCR3<sup>-/-</sup> Tiere. Ähnlich wie in Abb. 3 zeigten auch hier die Tiere, 24 Stunden nach der Induzierung des Schadens, große nekrotische Areale. Diese waren in der Gruppe, in welcher die NK-Zellen depletiert wurden, etwas größer, als in der Gruppe, welcher nur CCl<sub>4</sub> injiziert wurde. Die nekrotischen Areale waren nach 72h in der NK-Zell depletierten Gruppe sichtbar. Im Gegensatz dazu hatten sich die Lebern der Tiere, welche nur CCl<sub>4</sub> erhielten, nach dieser Zeit vollständig regeneriert.

### **3.1.5 Neutrophile Granulozyten vermitteln Leberschaden**

Der größere Leberschaden, trotz verringerter Anzahl an NK-Zellen in den CXCR3<sup>-/-</sup> Tieren oder fast gar keine NK-Zellen in den depletierten Tieren, war ein unerwartetes Ergebnis. In anderen Schädigungsmodellen wie z.B. einer Sepsis [105] oder einer Lebertransplantation [106] führte die Eliminierung von NK-Zellen zu einem geringeren Schaden.

Deshalb musste eine andere Immunzellpopulation den Schaden vermitteln.

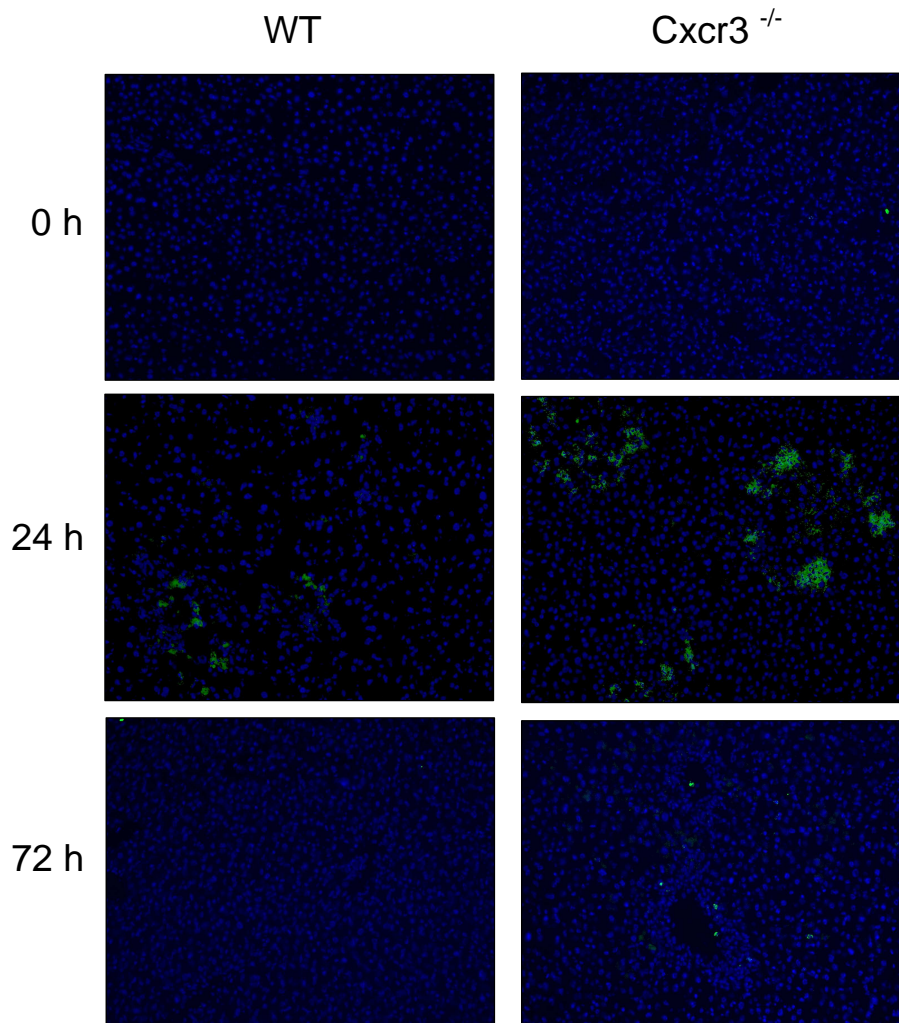
Neutrophile Granulozyten schienen dafür verantwortlich zu sein, da andere Forschungsgruppen schon gezeigt haben, dass diese Zellen auch Leberschädigungen vermitteln können [21, 23]. Aus diesem Grund wurde eine Immunfluoreszenzfärbung für Ly6G<sup>+</sup> Zellen und eine Naphtol-AS-D-Chloroacetat-Esterase Färbung durchgeführt, mit welchen man neutrophile Granulozyten detektieren kann. Das Diagramm in Abbildung 16 zeigt die Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung.



**Abb.16:** Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung zur Detektion von neutrophilen Granulozyten (Ly6g+ Zellen) in den Lebern zu den angegebenen Zeitpunkten nach der CCl<sub>4</sub> Injektion in Wildtypmäusen (weiße Balken) und in CXCR3<sup>-/-</sup> Mäusen (schwarze Balken)  
 \* =  $P < 0,05$ , \*\*\* =  $P < 0,001$

Die CCl<sub>4</sub> Injektion führte nach 24 Stunden zu einer stark erhöhten Infiltration von neutrophilen Granulozyten in die geschädigte Leber. Wobei CXCR3<sup>-/-</sup> Tieren doppelt so hohe Werte wie Wildtypentiere aufwiesen (72,5 ± 7,98 vs. 31,64 ± 6,83). Nach 72h sank die Zahl der intrahepatischen neutrophilen Granulozyten in beiden Gruppen wieder, wobei die CXCR3 *knockout* Tiere immer noch signifikant mehr Ly6G positive Zellen als die Wildtypkontrollen aufwiesen (10,3 ± 1,39 vs. 3 ± 0,91). Diese Ergebnisse sind in Abbildung 17 exemplarisch dargestellt.



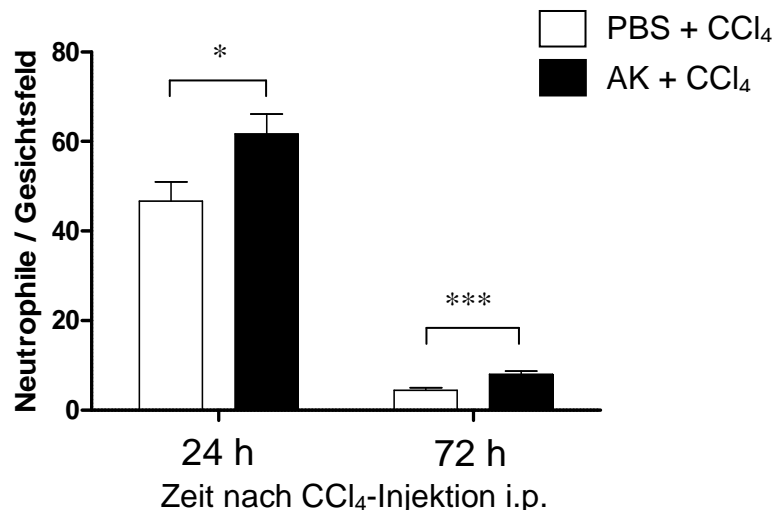


**Abb.17:** Exemplarische Immunfluoreszenz Färbung von Cryoschnitten der Leber von Unbehandelten (oben), 24h (mitte) und 72h (unten) nach der CCl<sub>4</sub>- Behandlung. Die neutrophilen Granulozyten erscheinen grün (Ly6g positiv) und die Zellkerne blau (DAPI).

Vergrößerung: 100 X

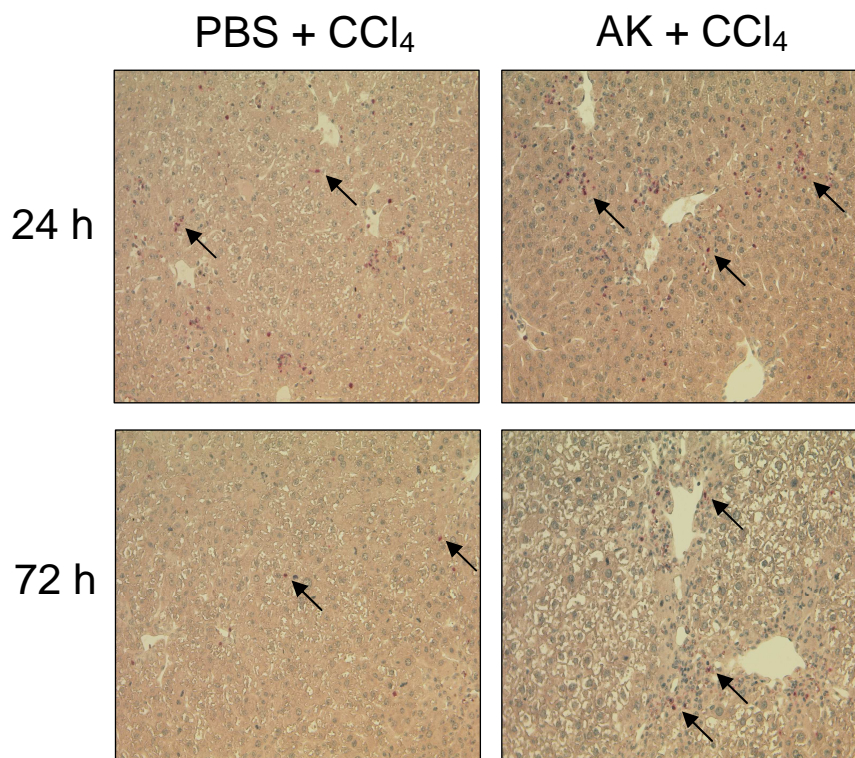
Man erkennt sehr deutlich, dass 24h nach der CCl<sub>4</sub> Behandlung mehr neutrophile Granulozyten (Ly6G positiv, grün) in die Lebern der CXCR3<sup>-/-</sup> Tiere eingewandert sind, als in die der Wildtypen. Wohingegen man nach 72h in den Wildtypen fast keine und in den CXCR3<sup>-/-</sup> Tieren noch einige wenige Ly6G positives Signale erkennen kann.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit der Naphtol-AS-D-Chloroacetat-Esterase Färbung, bei den NK-Zell depletierten Tieren erzielt. Auch hier führte die CCl<sub>4</sub>- Injektion zu einer gesteigerten Infiltration von neutrophilen Granulozyten in die Lebern (Abb.18).



**Abb.18:** Quantifizierung der Naphtol-AS-D-Chloroacetat-Esterase Färbung zur Detektion von neutrophilen Granulozyten in der Leber zu den angegebenen Zeitpunkten nach der CCl<sub>4</sub> Injektion in Wildtypmäusen. Die Tiere erhielten entweder CCl<sub>4</sub> und PBS (PBS + CCl<sub>4</sub>, weiße Balken) oder anti ASIALO GM1 Antikörper und CCl<sub>4</sub> (AK + CCl<sub>4</sub>, schwarze Balken) , \* =  $P < 0,05$ , \*\*\* =  $P < 0,001$

Wieder zeigten die Tiere, bei welchen die NK-Zellen depletiert wurden, 24 h nach der CCl<sub>4</sub> Injektion einen ähnlichen Phänotyp wie die CXCR3<sup>-/-</sup> Tiere, d.h. es waren signifikant mehr neutrophile Granulozyten in die Lebern gewandert als bei den Tieren, die nur mit CCl<sub>4</sub> behandelt wurden ( $61,67 \pm 4,46$  vs.  $46,67 \pm 4,28$ ). Nach 72 Stunden waren in beiden Gruppen wieder weniger neutrophile Granulozyten in den Lebern vorhanden. In der Gruppe, welche zusätzlich mit dem Antikörper anti ASIALO GM1 behandelt wurde, waren immer noch signifikant mehr neutrophile Granulozyten vorhanden als in der nicht depletierten Gruppe ( $8,00 \pm 0,75$  vs.  $4,5 \pm 0,51$ ).



**Abb.19:** Exemplarische Naphtol-AS-D-Chloroacetat-Esterase Färbung zur Detektion von neutrophilen Granulozyten von in Parafin eingebetteten Schnitten der Leber zu den angegebenen Zeitpunkten nach der CCl<sub>4</sub>- Behandlung. Links sind die Färbungen von den Tieren denen PBS und CCl<sub>4</sub> injiziert wurde und rechts die von den Tieren, welchen anti ASIALO GM1 und CCl<sub>4</sub> injiziert wurde. Die Pfeile markieren die positiv gefärbten neutrophilen Granulozyten. Vergrößerung: 100 X

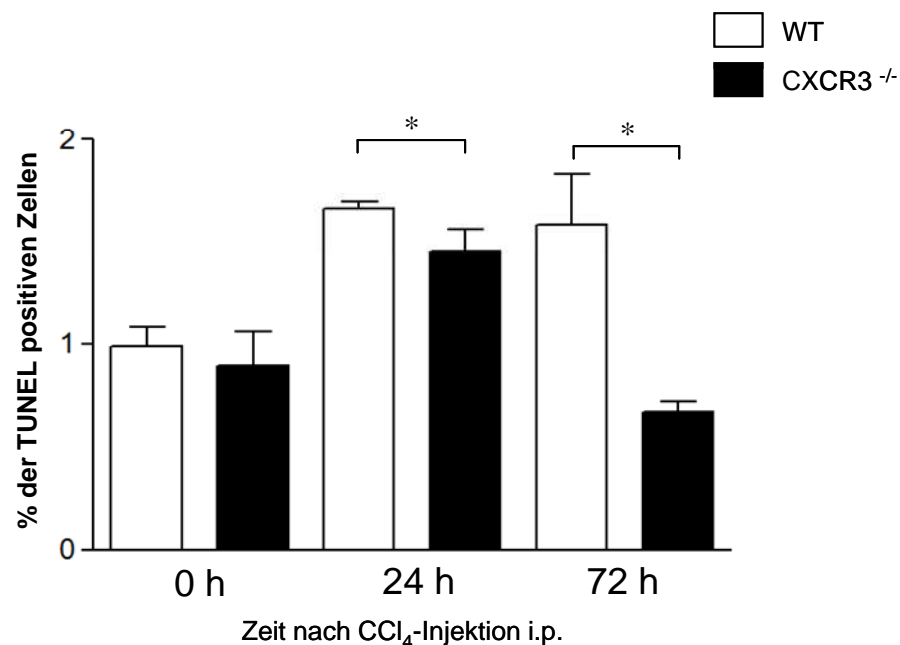
Abbildung 19 zeigt die repräsentativen histologischen Bilder, in welchen die positiv gefärbten neutrophilen Granulozyten rot erscheinen und zusätzlich teilweise durch Pfeile markiert sind.

### 3.1.6 Mechanismus der Neutrophilenrekrutierung

Nachdem die Immunzellpopulation identifiziert wurde, welche zumindest einen Teil des Leberschadens vermittelt, sollte mit den folgenden Experimenten der Mechanismus analysiert werden, über welchen die neutrophilen Granulozyten rekrutiert werden. Die Arbeitsgruppe um Scafidi konnte nachweisen, dass nekrotische Zellen das Protein HMGB1 (*High mobility group box 1*) freisetzen,

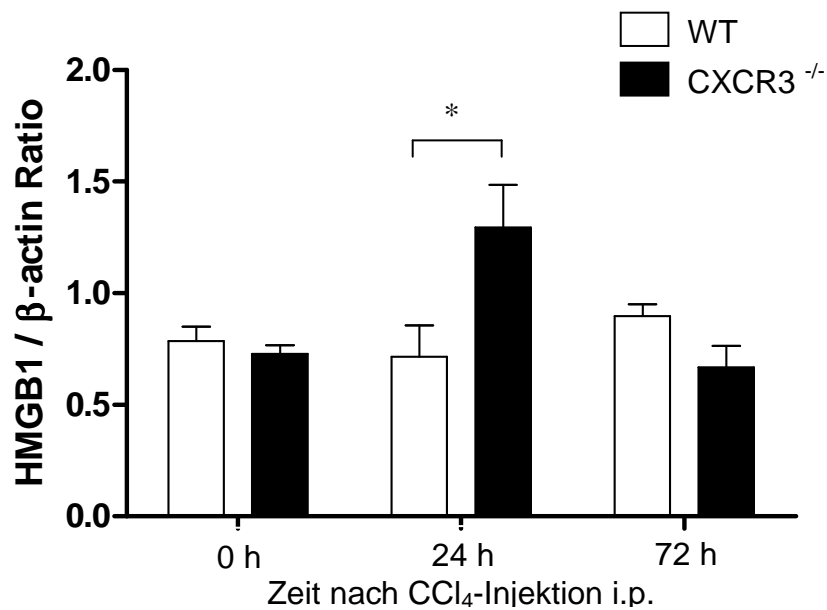
während bei apoptotischen Zellen dieses Protein in den gebildeten apoptotischen Vesikeln eingeschlossen ist [107]. Das freigesetzte HMGB1 bindet dann an Immunzellen, wie z.B. Makrophagen. Diese sezernieren dann proinflammatorische Zytokine, wie z.B. KC, welches wiederum neutrophile Granulozyten rekrutieren kann [17].

Aus diesem Grund wurde, zur Quantifizierung der Apoptoserate, ein sogenannte TUNEL-Färbung [108] durchgeführt. In Abbildung 20 sind die Ergebnisse der TUNEL-Färbung dargestellt.



**Abb.20:** Quantifizierung der TUNEL-Färbung zur Detektion von apoptotischen Zellen in der Leber zu den angegebenen Zeitpunkten nach der CCl<sub>4</sub> Injektion in Wildtypmäusen (WT, weiße Balken) und in CXCR3<sup>-/-</sup> Mäusen (CXCR3 KO, schwarze Balken), \* =  $P < 0,05$

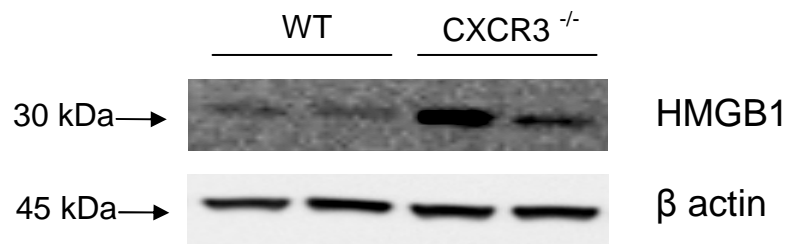
Man kann klar erkennen, dass die unbehandelten Tiere in beiden Gruppen eine geringe Apoptose aufweisen. Die Injektion von Tetrachlorkohlenstoff führte in beiden Gruppen zu einem Anstieg der Apoptoserate. Im Vergleich zu den Wildtypmäusen, hatten die CXCR3<sup>-/-</sup> Mäuse, zu jedem untersuchten Zeitpunkt, signifikant weniger TUNEL positive Zellen, d.h. eine geringere Apoptose. Anschließend wurde mittels Western Blot die intrahepatische HMGB1 Konzentration analysiert. Dieser erhöhte nekrotische Schaden führt dann auch zu einer erhöhten HMGB1 Konzentration in den geschädigten Lebern, wie man der Abbildung 21 entnehmen kann.



**Abb.21:** Quantifizierung des HMGB1 Western Blot von Proteinlysaten aus den Lebern zu den angegebenen Zeitpunkten nach der CCl<sub>4</sub> Injektion in Wildtypmäusen (WT, weiße Balken) und in CXCR3<sup>-/-</sup> Mäusen (CXCR3 KO, schwarze Balken) , \* =  $P < 0,05$

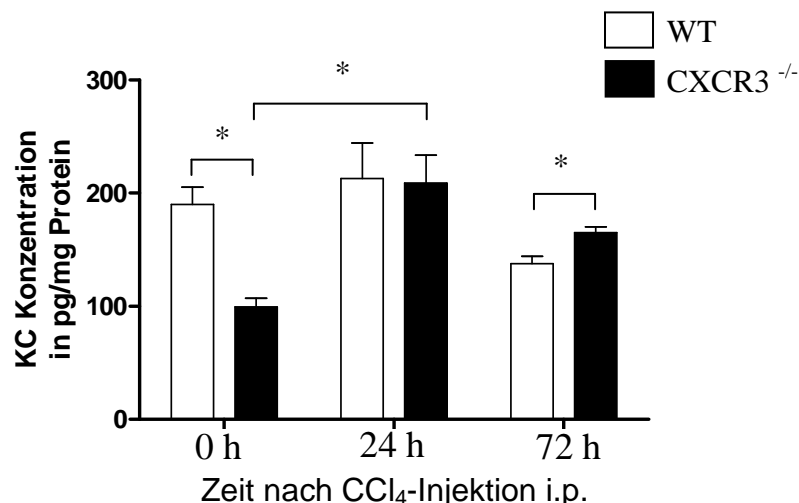
In den Wildtyptieren konnte über den gesamten Zeitraum des Experimentes keine signifikante Veränderung der HMGB1 Konzentration in den Lebern beobachtet werden. Die Induktion des Leberschadens mittels CCl<sub>4</sub> führte in den CXCR3<sup>-/-</sup> Tieren, nach 24 Stunden zu einer Verdoppelung der intrahepatischen HMGB1 Konzentration, welche sich nach 72h wieder auf den Ausgangswert reduzierte. Somit kann man sagen, dass der verstärkt auftretende Leberschaden in den CXCR3<sup>-/-</sup> Tieren (Abb.5) überwiegend nekrotischer Natur ist.

Die Ergebnisse der Quantifizierung des HMGB1 Western Blot sind in Abbildung 22 durch einen repräsentativen Western Blot gezeigt. Da 24 Stunden nach der CCl<sub>4</sub>-Injektion der größte Unterschied zu finden war, ist nur dieser Zeitpunkt exemplarisch dargestellt.



**Abb.22:** Repräsentativer HMGB1 Western Blot von Proteinlysaten aus den Lebern 24 Stunden nach der CCl<sub>4</sub> Injektion in Wildtypmäusen (WT, links) und in CXCR3<sup>-/-</sup> Mäusen (CXCR3 KO, rechts) in Doppelbestimmung

Wie bereits erwähnt, führt ein Anstieg der HMGB1 Konzentration zu einer vermehrten Produktion von dem Zytokin KC, welches wiederum effektiv neutrophile Granulozyten rekrutieren kann [22]. Dies konnte mittels ELISA (*Enzym-linked Immunosorbent Assay*), einer Methode zur genauen Quantifizierung von Proteinen, nachgewiesen werden (Abb.23). In den Wildtypen konnte auch bei diesem untersuchten Parameter keine Änderung über den Versuchszeitraum festgestellt werden. Zwar fällt die intrahepatische KC Konzentration 72h nach der CCl<sub>4</sub>- Injektion von 212,82 pg/mg ± 31,49 auf einen Wert von 137,75 pg/mg ± 6,41 leicht ab, aber dies ist kein signifikanter Unterschied.



**Abb.23:** Quantifizierung der KC Konzentration von Proteinlysaten aus der Leber zu den angegebenen Zeitpunkten nach der CCl<sub>4</sub> Injektion in Wildtypmäusen (WT, weiße Balken) und in CXCR3<sup>-/-</sup> Mäusen (CXCR3 KO, schwarze Balken) , \* =  $P < 0,05$

Die CXCR3<sup>-/-</sup> Tiere hingegen hatten schon vor der CCl<sub>4</sub>- Behandlung eine signifikant geringere KC Konzentration in der Leber als die unbehandelten Wildtypkontrollen (99,21 pg/mg ± 7,74 vs. 189,94 pg/mg ± 15,35).

Die CCl<sub>4</sub> -Injektion führte, in den CXCR3<sup>-/-</sup> Tieren, im Gegensatz zu den Wildtypen, nach 24h zu einer drastischen Steigerung der intrahepatischen KC Konzentration auf 208,89 pg/mg ± 24,68, welche nach 72h mit einem Wert von 165,09 pg/mg ± 5,09 immer noch erhöht war.

Zusammenfassend kann man sagen, dass in den CXCR3<sup>-/-</sup> Tieren, die Injektion von Tetrachlorkohlenstoff nach 24 Stunden den größten Schaden in der Leber hervorruft (Abb.5). Dieser Schaden ist überwiegend nekrotischer Natur (Abb.20), welcher in einer erhöhten intrahepatischen HMGB1-Konzentration und nachfolgend in einer vermehrten Produktion des Zytokins KC (Abb.23) zu diesem Zeitpunkt resultiert. Dies führt dann zu einer vermehrten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die geschädigten Lebern welche wiederum den vorhandenen Schaden verstärken können.

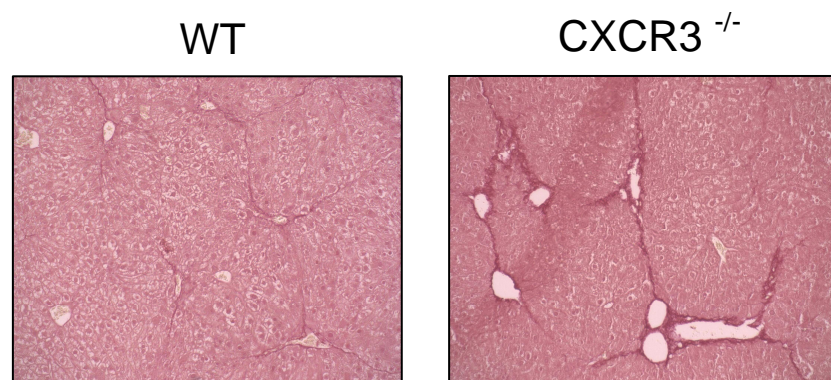
## 3.2 Chronische Leberschädigung

In verschiedenen anderen Fibrosemodellen, wie z.B. bei der Bleomycin induzierten Lungenfibrose [94] konnte dem Chemokinrezeptor CXCR3 schon eine bedeutende Rolle zugeordnet werden. Um die Effekte des Rezeptors im Rahmen der Leberfibrose genauer zu charakterisieren, wurde in Wildtypmäusen und CXCR3 *knockout* Mäusen eine Fibrose, zum einem mittels Tetrachlorkohlenstoff und zum anderen mit Thioacetamid ausgelöst.

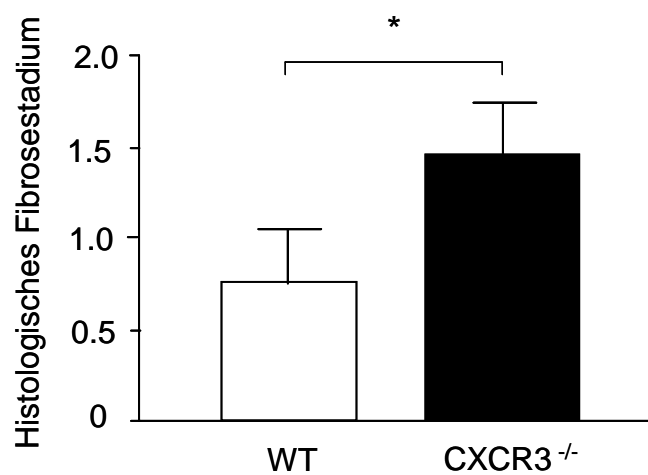
### 3.2.1 CXCR3 *knockout* Tiere entwickeln eine starke Fibrose

Nachdem die Tiere über einen Zeitraum von 6 Wochen, zweimal wöchentlich eine CCl<sub>4</sub> Injektion erhalten haben, wurden die Lebern entnommen und sowohl histologisch als auch biochemisch analysiert. Die CXCR3<sup>-/-</sup> Tiere entwickelten eine stärkere Leberfibrose als die Wildtypiere, wie man in den Sirius-Rot Färbungen (Abb.24) erkennen kann. In beiden Gruppen kann man eine

Fibrosierung der Leber erkennen, wobei die Fibrosesepten bei den Wildtypmäuern schwächer ausgebildet sind als bei den CXCR3<sup>-/-</sup> Tieren. Zusätzlich wurden die Lebern von einem Pathologen, basierend auf der Desmet Scheuer Skala, nach dem Stadium der entwickelten Fibrose beurteilt (Abb.25). Die Quantifizierung der verschiedenen Fibrosegrade bestätigte die Ergebnisse der Sirius-Rot Färbungen, d.h. die CXCR3<sup>-/-</sup> Tiere hatten im Durchschnitt eine stärkere Fibrose ausgebildet.



**Abb.24:** Repräsentative Sirius-Rot Färbung der Lebern nach 6 Wochen CCl<sub>4</sub> Behandlung von Wildtypmäusen (links) und CXCR3<sup>-/-</sup> Mäusen (rechts). Vergrößerung 100x

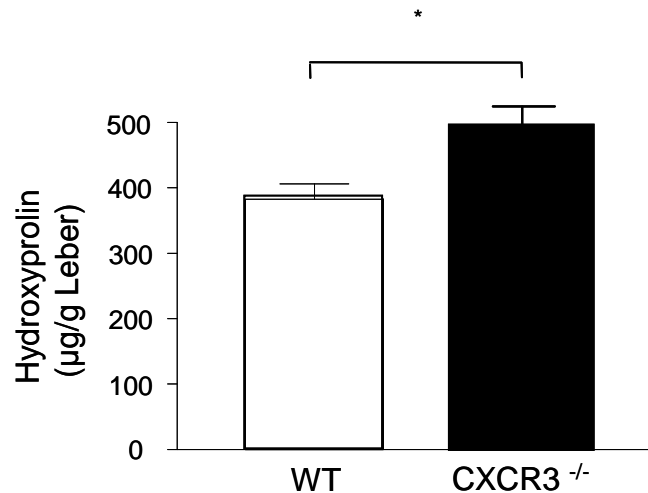


**Abb.25:** Quantifizierung der Fibroestadien der Lebern nach 6 Wochen CCl<sub>4</sub> Behandlung von Wildtypmäusen (weiße Balken) und CXCR3<sup>-/-</sup> Mäusen (schwarze Balken) , \* =  $P < 0,05$

Anschließend wurde die Fibrosierung biochemisch, durch die Messung der Kollagen-spezifischen Aminosäure Hydroxyprolin, quantifiziert (Abb.26). Die Ergebnisse aus den histologischen Untersuchungen spiegeln sich in dem

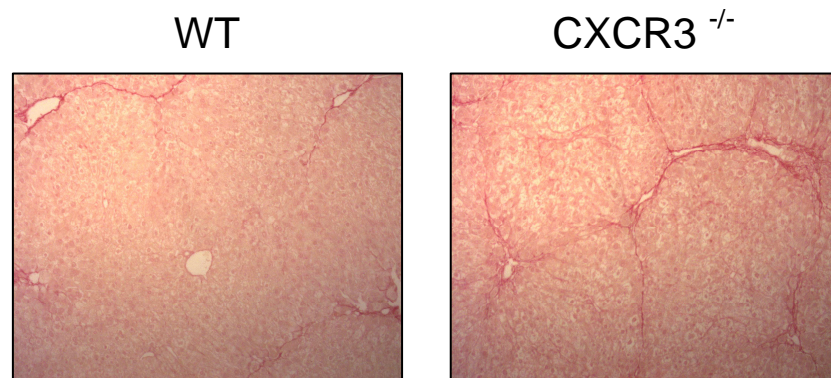


intrahepatischen Hydroxyprolingehalt wider. Die CXCR3<sup>-/-</sup> Tiere wiesen signifikant mehr Hydroxyprolin in den fibrotischen Lebern auf als die Wildtyptiere.

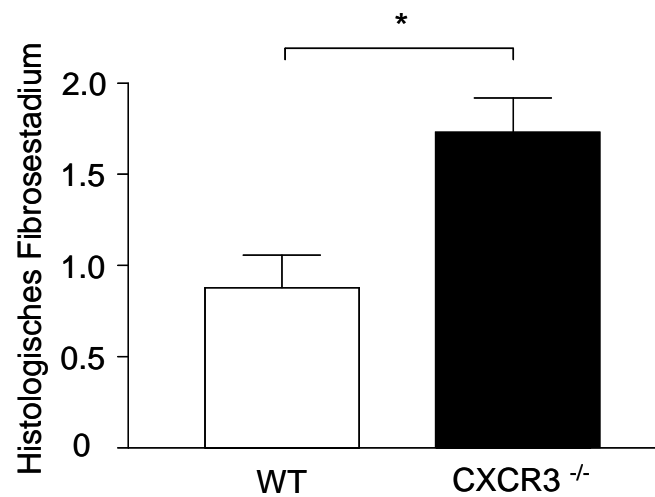


**Abb.26:** Quantifizierung des Hydroxyprolingehaltes in den Lebern nach 6 Wochen CCl<sub>4</sub> Behandlung von Wildtypmäusen (weiße Balken) und CXCR3<sup>-/-</sup> Mäusen (schwarze Balken)  
\* =  $P < 0,05$

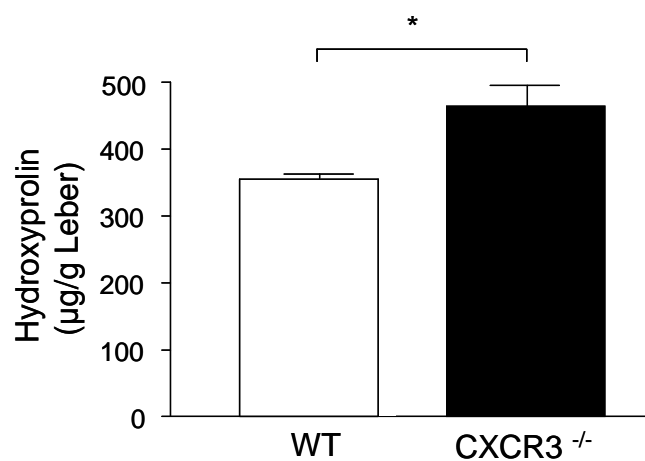
Zur Validierung der oben gezeigten Ergebnisse wurde ein zweites toxisches Fibrosemodell, die intraperitoneale Injektion von Thioacetamid (TAA), verwendet. Den Wildtyp- und CXCR3<sup>-/-</sup> Tieren wurde über einen Zeitraum von 6 Wochen, dreimal wöchentlich TAA verabreicht. Anschließend wurden die Lebern entnommen und ebenfalls histologisch und biochemisch analysiert. Wie man den nachfolgenden Abbildungen entnehmen kann, wurden auch mit diesem Fibrosemodell ähnliche Ergebnisse erzielt. Die CXCR3<sup>-/-</sup> Mäuse hatten stärker ausgebildete fibrotische Septen als die Wildtypmäuse (Abb.27) und somit auch ein höheres Fibrotestadium (Abb.28).



**Abb.27:** Repräsentative Sirius-Rot Färbung der Lebern nach 6 Wochen TAA Behandlung von Wildtypmäusen (links) und CXCR3<sup>-/-</sup> Mäusen (rechts). Vergrößerung 100x



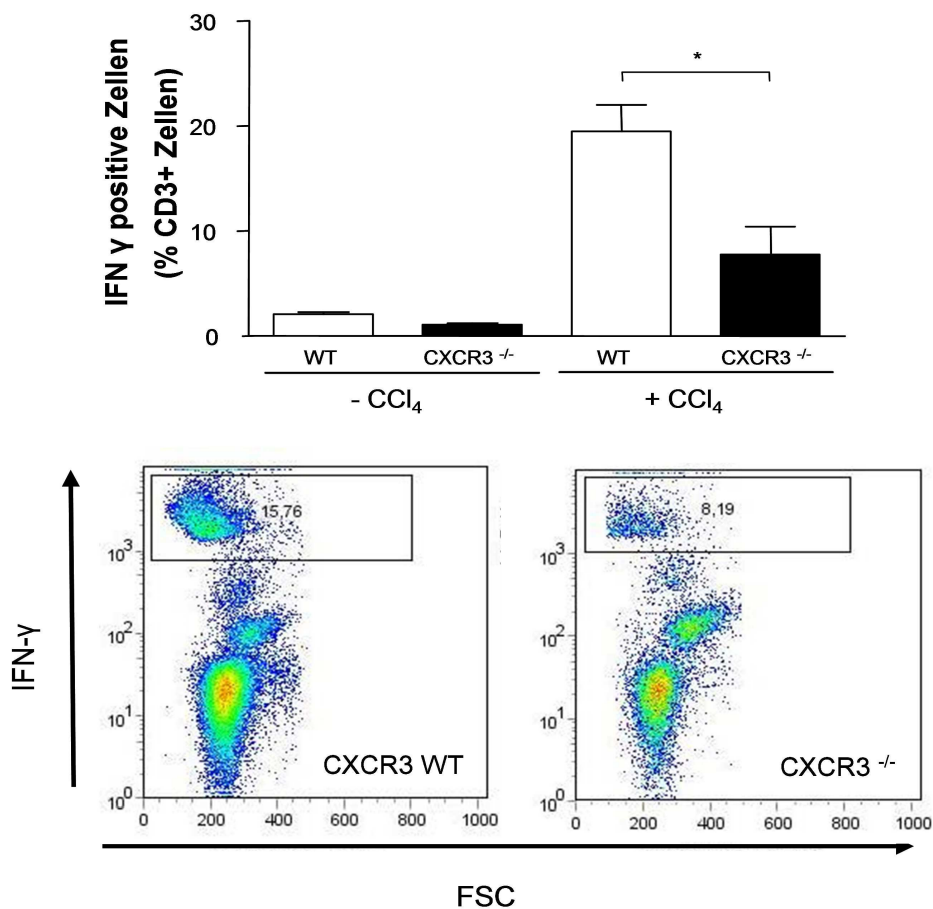
**Abb.28:** Quantifizierung der Fibrorestadien der Lebern nach 6 Wochen TAA Behandlung von Wildtypmäusen (weiße Balken) und CXCR3<sup>-/-</sup> Mäusen (schwarze Balken) , \* =  $P < 0,05$



**Abb.29:** Quantifizierung des Hydroxyprolinegehaltes in den Lebern nach 6 Wochen TAA Behandlung von Wildtypmäusen (weiße Balken) und CXCR3<sup>-/-</sup> Mäusen (schwarze Balken) , \* =  $P < 0,05$

Auch nach 6-wöchiger Behandlung mit Thioacetamid zeigten die CXCR3<sup>-/-</sup> Tiere einen signifikant höheren Hydroxyprolinegehalt im Vergleich zu den Wildtypkontrollen (Abb.29).

Da der Chemokinrezeptor CXCR3 die Rekrutierung von TH1 assoziierten IFN- $\gamma$  produzierenden Immunzellen vermittelt, wurden die fibrotischen Lebern von den Wildtyp- und den CXCR3<sup>-/-</sup> Tieren durchflusszytometrisch hinsichtlich dieser Immunzellpopulation untersucht.

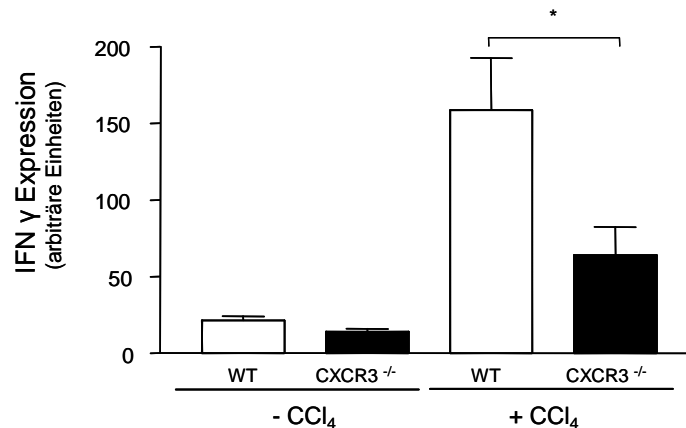


**Abb.30:** (oben) Quantifizierung der Infiltration von IFN- $\gamma$  positiven, CD3 positiven Immunzellen in die Leber von unbehandelten (-CCl<sub>4</sub>) Wildtypmäusen (weiße Balken) und CXCR3<sup>-/-</sup> Mäusen (schwarze Balken) und nach 6 Wochen CCl<sub>4</sub> Behandlung (+CCl<sub>4</sub>) , \* =  $P < 0,05$   
(unten) Repräsentativer *FACS Dot Plot* der rekrutierten IFN- $\gamma$  positiven und CD3 positiven Immunzellen in die fibrotischen Lebern nach 6 wöchiger CCl<sub>4</sub> Behandlung

Wie zu erwarten führte das Fehlen des Rezeptors CXCR3 zu einer bis zu 50 % geringeren Rekrutierung von IFN- $\gamma$  produzierenden Immunzellen in den

*knockout* Tieren im Vergleich zu den Wildtypkontrollen. Die geringere Anzahl von IFN- $\gamma$  produzierenden Immunzellen resultierte auch in einer, bis zu 50 % geringeren intrahepatischen IFN- $\gamma$  Expression in den CXCR3<sup>-/-</sup> Tieren, wie man der Abbildung 31 entnehmen kann.

In beiden Gruppen gibt es aber vor der Behandlung mit CCl<sub>4</sub> keinen Unterschied hinsichtlich der Immunzellpopulation oder der IFN- $\gamma$  Expression.

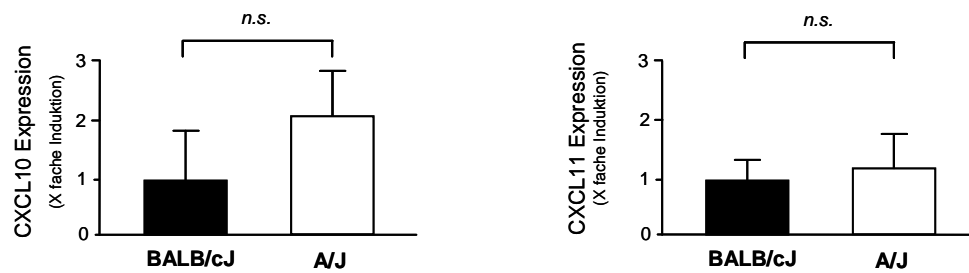


**Abb.31:** Durch RT-PCR ermittelte intrahepatische IFN- $\gamma$  Expression in den Lebern von unbehandelten (-CCl<sub>4</sub>) und Wildtypmäusen (weiße Balken) und CXCR3<sup>-/-</sup> Mäusen (schwarze Balken) und nach 6 Wochen CCl<sub>4</sub> Behandlung (+CCl<sub>4</sub>) , \* =  $P < 0,05$

### 3.2.2 Expression der CXCR3 Liganden

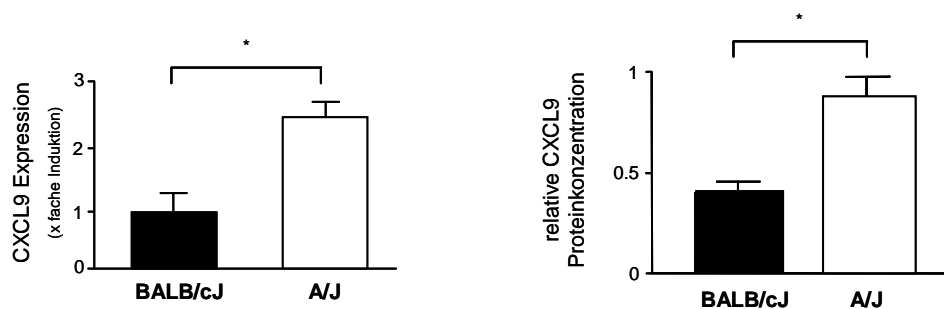
In einem nächsten Schritt wurde die Expression der drei Liganden des Chemokinrezeptors CXCR3 in fibrotischen Lebern untersucht. Dafür wurde bei Wildtypmäusen zweier unterschiedlicher Stämme, mittels CCl<sub>4</sub>, abermals Fibrose induziert. Zum einem wurde der Stamm BALB/cJ verwendet, da dieser sehr schnell und stärker eine Fibrose entwickelt und zum anderem wurde der fibroseresistente Stamm A/J verwendet.

Interessanterweise konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression der Chemokine CXCL10 und CXCL11 in den fibrotischen Lebern beider Stämme nachgewiesen werden (Abb.32)



**Abb.32:** Durch RT-PCR ermittelte intrahepatische CXCL10 Expression (links) und CXCL11 Expression (rechts) in den Lebern von Wildtypmäusen vom Stamm BALB/cJ (schwarze Balken) und A/J (weiße Balken) nach 6 Wochen CCl<sub>4</sub> Behandlung.

Die intrahepatische Expression und Proteinkonzentration des Chemokins CXCL9 war hingegen in dem fibroseresistenten A/J Stamm, im Vergleich zu dem fibroseanfälligen BALB/cJ Stamm, signifikant erhöht (Abb.33).



**Abb.33:** Durch RT-PCR ermittelte intrahepatische CXCL9 Expression (links) Wildtypmäusen vom Stamm BALB/cJ (schwarze Balken) und A/J (weiße Balken) nach 6 Wochen CCl<sub>4</sub> Behandlung, \* =  $P < 0,05$

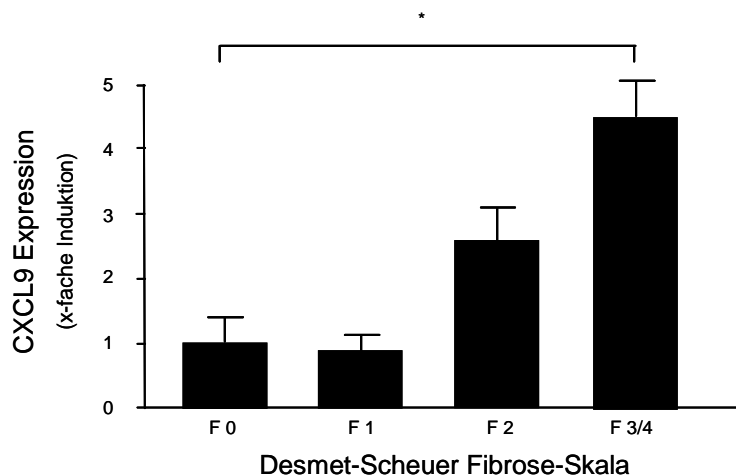
Durch Westen Blot ermittelte relative Proteinkonzentration (rechts) in den Lebern von Wildtypmäusen vom Stamm BALB/cJ (schwarze Balken) und A/J (weiße Balken). Angegeben ist das Verhältnis der CXCL9 Konzentration zwischen unbehandelten Tieren und nach 6 Wochen CCl<sub>4</sub> Behandlung.

Basierend auf den Daten der Tierversuche wurden nachfolgend humane Serum- und Leberbiopsieproben hinsichtlich der Konzentration bzw. Expression des Chemokins CXCL9 untersucht.

### 3.2.3 Humane Daten

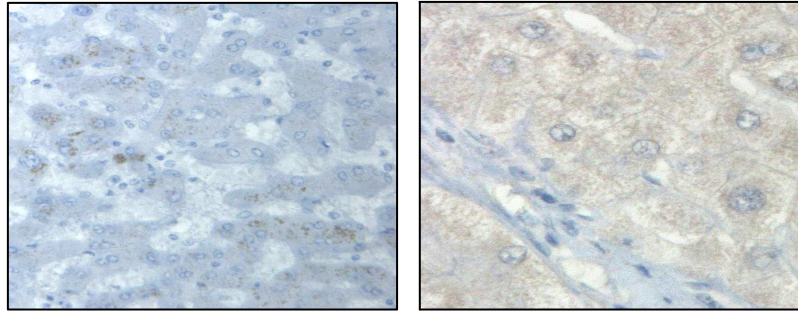
Zur Verifizierung der *in vivo* Daten wurde die CXCL9 Expression in humanen Leberbiopsieproben analysiert. Die Biopsieproben stammen von Patienten die an einer durch Hepatitis C ausgelösten Fibrose litten. Diese Proben wurden vorher von einem Pathologen, basierend auf der Desmet Scheuer Skala, nach ihrem Fibrorestadium eingeteilt, wobei F0 gesund und F4 sehr schwere Fibrose bedeutet.

Man erkennt eine positive Korrelation der intrahepatischen CXCL9 Expression mit fortschreitendem Fibrorestadium (Abb.34). In der Gruppe der Patienten mit schwerer bzw. sehr schwerer Fibrose (F3/4) war die mRNA Expression des Chemokins CXCL9, im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe (F0) signifikant erhöht, während bei Patienten mit leichter Fibrose (F1) keine Veränderung der CXCL9 Expression nachgewiesen werden konnte.



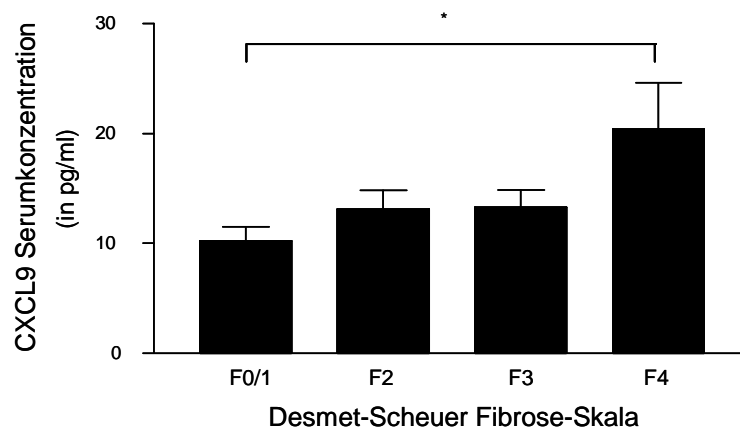
**Abb.34:** Durch RT-PCR ermittelte intrahepatische CXCL9 Expression in humanen Leberbiopsieproben von Patienten mit unterschiedlich stark ausgebildeter Fibrose, \* =  $P < 0,05$

Die erhöhte CXCL9 Expression in fibrotischen Lebern konnte auch immunhistochemisch nachgewiesen werden. Während bei einem gesunden Patienten nur wenig CXCL9 nachgewiesen werden konnte, wurde bei Patienten mit schwerer HCV induzierter Fibrose sehr viel CXCL9 detektiert (Abb.34)



**Abb.34:** Immunhistochemisch ermitteltes CXCL9 in humanen Leberbiopsieproben von gesunden Patienten (links) und mit schwerer HCV induzierter Fibrose (rechts). Positiv gefärbtes CXCL9 erscheint in dieser Färbung braun. Vergrößerung 200x

Anschließend wurde die Serumkonzentration des Chemokins CXCL9 mittels ELISA gemessen und mit den Fibrosegraden korreliert. Auch hier stieg, mit zunehmender Fibrosierung, die Serumkonzentration des Chemokins signifikant an (Abb.35).

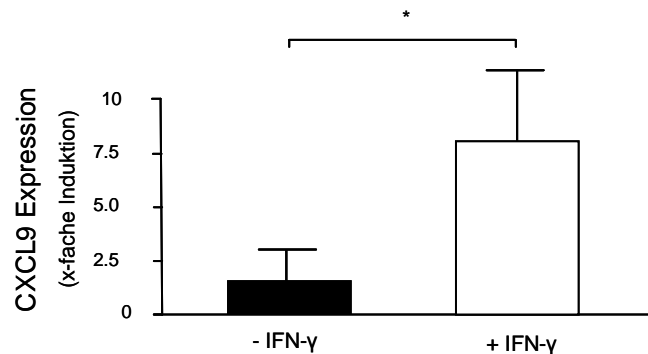


**Abb.35:** Quantifizierung der CXCL9 Serumkonzentration von Patienten mit unterschiedlich stark ausgebildeter Fibrose, \* =  $P < 0,05$

Somit liegt die Vermutung nahe, dass das Chemokin CXCL9 profibrotische Effekte aufweist. Um diese genauer zu analysieren, wurden im folgenden *in vitro* Versuche durchgeführt.

### 3.2.4 CXCL9 hat antifibrotische Effekte *in vitro*

Mit den *in vitro* Versuchen sollten die Effekte von CXCL9 auf hepatische Sternzellen untersucht werden, da auch diese den Chemokinrezeptor CXCR3 exprimieren [72]. Dafür wurde die humane LX2 Sternzelllinie verwendet. Als erstes wurde überprüft, ob humane Sternzellen, nach der Stimulation mit IFN- $\gamma$  auch selbst das Chemokin CXCL9 produzieren.

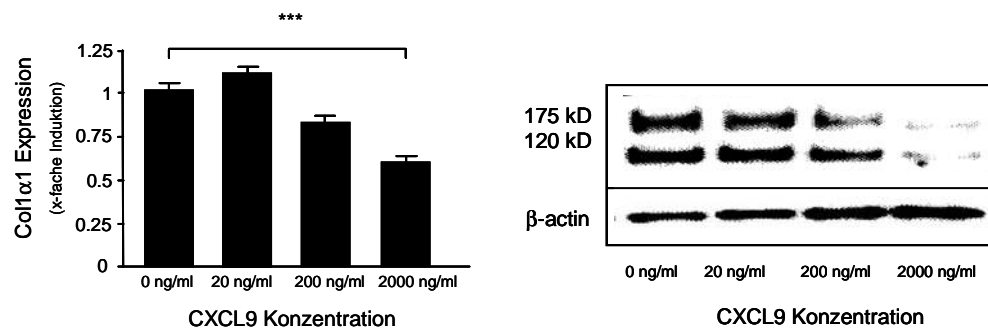


**Abb.36:** Durch RT-PCR ermittelte CXCL9 Expression in humanen Sternzellen vor der Stimulation mit IFN- $\gamma$  (schwarze Balken) und 48h nach der Stimulation mit IFN- $\gamma$  (weiße Balken)  
\* =  $P < 0,05$

Wie man der Abbildung 36 entnehmen kann, führt die Stimulation mit IFN- $\gamma$ , auch in hepatischen Sternzellen, zu einer vermehrten Expression des Chemokins CXCL9. Nach 48 stündiger Inkubation mit rekombinaten IFN- $\gamma$ , erhöhte sich die CXCL9 Expression um das 7,5 fache im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Somit konnten die Sternzellen als einer der Produzenten von CXCL9 identifiziert werden.

Um die Effekte von CXCL9 auf die Sternzellen zu charakterisieren wurden anschließend humane LX2 Zellen mit rekombinaten CXCL9 in verschiedenen Dosen für 48h stimuliert.





**Abb.37:** Durch RT-PCR ermittelte Col1α1 Expression in humanen Sternzellen 48h nach der Stimulation mit der angegebenen Dosis rekombinatem CXCL9 (rechts), \* =  $P < 0,05$   
Durch Western Blot ermittelte Kollagenkonzentration in humanen Sternzellen 48h nach der Stimulation mit der angegebenen Dosis rekombinatem CXCL9 (links).

Die Stimulation der Sternzellen mit CXCL9 resultierte in einer 50 prozentigen Reduktion der Expression des Kollagens Col1α1, welches ein Hauptbestandteil der fibrotischen Septen darstellt (Abb.37, links). Dieser Effekt war dosisabhängig, d.h. je höher die CXCL9 Konzentration war, umso geringer war die Col1α1 Expression. Die reduzierte Expression spiegelte sich auch auf Proteinebene wider (Abb.37, rechts). Man erkennt deutlich eine Abnahme der Intensität, der für Kollagen typischen Banden, bei 175kD und bei 120 kD.

Somit scheint das Chemokin CXCL9, *in vitro*, antifibrotische Effekte zu vermitteln.

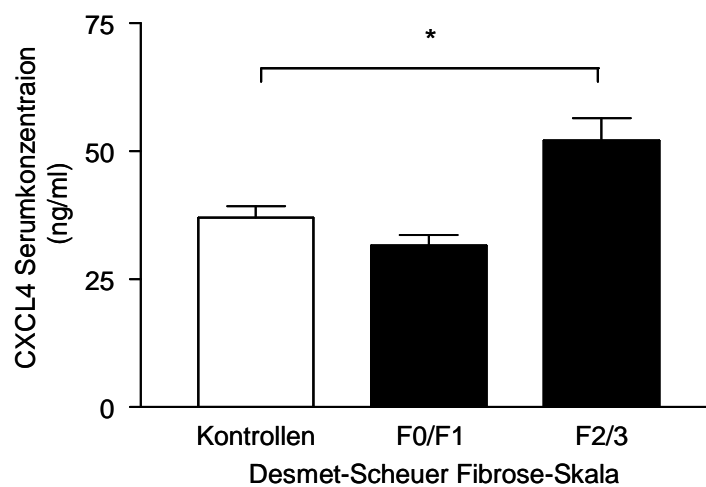
Wie bereits erwähnt gibt es 2 *Splice*-Varianten des Rezeptors CXCR3, welche gegensätzliche Effekte vermitteln können. Mit den oben beschriebenen Experimenten wurden einige Effekte des Chemokins CXCL9, welches an den Rezeptor CXCR3 A bindet, beschrieben. In den nachfolgenden Versuchen wurden die Effekte des Chemokins CXCL4, welches vorrangig an den Rezeptor CXCR3 B bindet, charakterisiert.

### 3.3 Das Chemokin CXCL4

In einem ersten Schritt wurde überprüft, ob das Chemokin CXCL4 im Rahmen der humanen Leberfibrose eine Rolle spielt. Dafür wurden die CXCL4 Serumkonzentrationen von Patienten mit unterschiedlich stark ausgebildeter HCV-induzierter Fibrose gemessen.

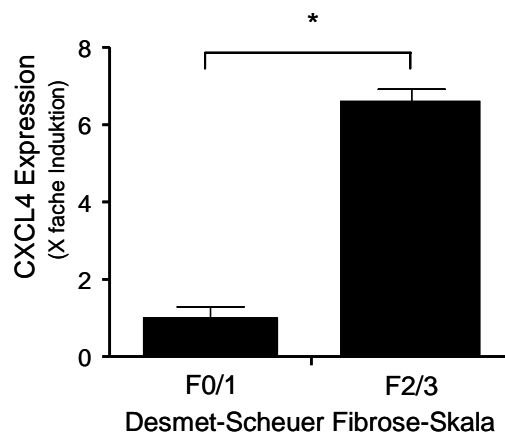
#### 3.3.1 Humane Daten

Auf Grund der begrenzten Verfügbarkeit von humanen Proben, wurden die Ergebnisse von den Patienten mit keiner (F0) bzw. sehr geringer Fibrose (F1) und die von Patienten mit mittlerer (F2) und starker Fibrose (F3) zusammengefasst. Die Proben von Patienten mit sehr stark ausgebildeter Fibrose (F4) wurden nicht analysiert, da diese eine sehr geringe Anzahl von Thrombozyten hatten.



**Abb.38:** Quantifizierung der CXCL4 Serumkonzentration von Patienten mit unterschiedlich stark ausgebildeter Fibrose. Als Kontrolle dienten gesunde Probanden. \* =  $P < 0,05$

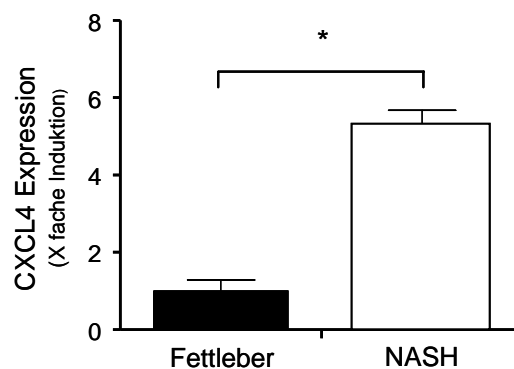
Man erkennt deutlich eine signifikante Steigerung der CXCL4 Serumkonzentration mit fortschreitender Fibrose (F2/F3) im Vergleich zu beginnender Fibrose (F0/F1) bzw. gesunden Probanden. Anschließend wurde die CXCL4 Expression in Leberbiopsieproben dieser Patienten untersucht.



**Abb.39:** Durch RT-PCR ermittelte intrahepatische CXCL4 Expression in humanen Leberbiopsieproben von Patienten mit unterschiedlich stark ausgebildeter Fibrose, \* =  $P < 0,05$

Die erhöhten Serumkonzentrationen bei fortgeschrittener Fibrose (F2/F3) wurden durch eine verstärkte intrahepatische CXCL4 Expression bestätigt. Die Expression in diesen Fibroestadien war im Vergleich zu milden Fibrose (F0/F1) um den Faktor 6 erhöht.

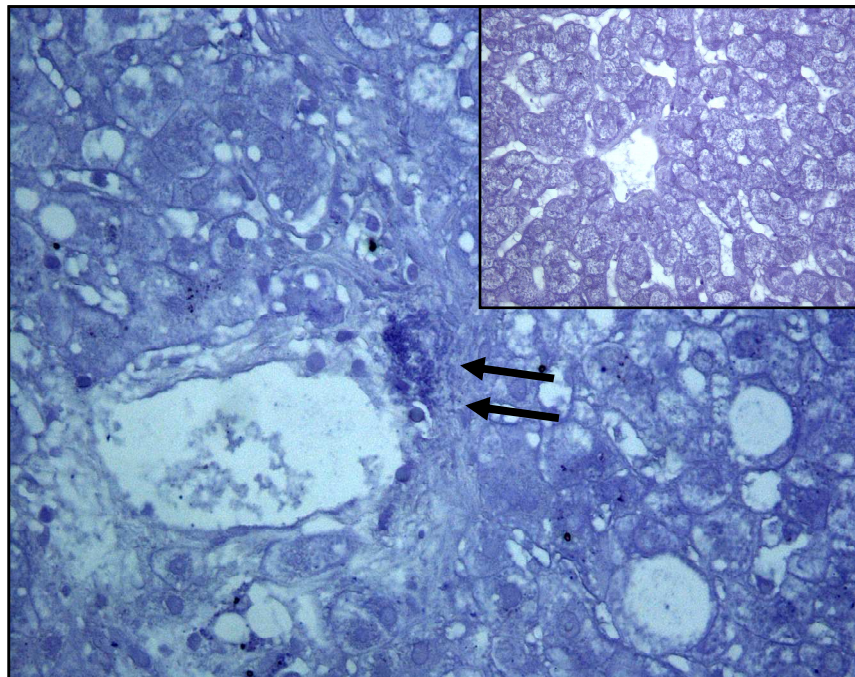
Zusätzlich wurde die intrahepatische CXCL4 Expression in Patienten mit anderen Lebererkrankungen untersucht. Dafür wurden Leberbiopsieproben von Patienten mit einer Fettlebererkrankung und mit NASH (*non alcoholic steato hepatitis*), das fortgeschrittene Stadium einer Fettleber, analysiert.



**Abb.40:** Durch RT-PCR ermittelte intrahepatische CXCL4 Expression in humanen Leberbiopsieproben von Patienten mit einer Fettlebererkrankung (schwarze Balken) und NASH (weiße Balken), \* =  $P < 0,05$

Auch hier stieg die CXCL4 Expression mit fortgeschrittener Lebererkrankung (NASH) im Vergleich zu beginnender Erkrankung (Fettleber) signifikant, um das fünffache an.

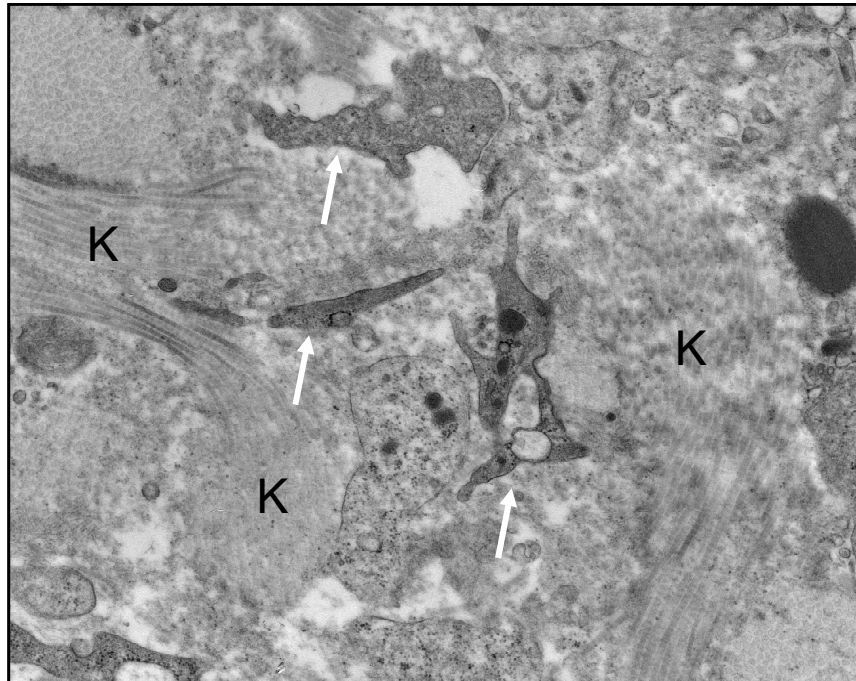
Da Thrombozyten die Hauptquelle für das Chemokin CXCL4 sind, wurden abschließend immunhistochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Dafür wurden Leberbiopsien von Patienten mit HCV induzierter Fibrose verwendet.



**Abb.41:** Immunhistochemische Untersuchung hinsichtlich der Thrombozytenaggregation (schwarze Pfeile) in einer fibrotischen Leber. Oben rechts ist eine normale Leber ohne Fibrose abgebildet.

Mittels der immunhistochemischen Untersuchung (Abb. 41) konnte die Aggregation der Thrombozyten in der mit HCV infizierten, fibrotischen Leber gezeigt werden.

Mittels Elektronenmikroskopie (Abb.42) konnten die Thrombozyten besser visualisiert werden.



**Abb.42:** Elektronenmikroskopische Untersuchung einer fibrotischen Leber. Die weißen Pfeile zeigen die Thrombozyten in der Nähe der Kollagenfibrillen (K). Vergrößerung 17000 x

Man kann erkennen, dass sich die Thrombozyten in direkter Nähe zu den Kollagenfibrillen (K) befinden.

Durch die oben dargestellten Experimente konnte nachgewiesen werden, dass Thrombozyten und somit auch das Chemokin CXCL4 im Rahmen der HCV induzierten Fibrose involviert sind.

Eine weitere Charakterisierung des Chemokins CXCL4 wurde von Frau Pauels durch *in vivo* Experimente, im Rahmen ihrer Doktorarbeit, vorgenommen (unveröffentlicht). So konnte mittels Tierversuchen nachgewiesen werden, dass die Injektion von  $\text{CCl}_4$  und TAA zu einer signifikant gesteigerten intrahepatischen CXCL4 Konzentration, schon in der Frühphase der Fibrose, führte. Ebenso konnten die Thrombozytenaktivierung und deren Aggregation in den Lebern gezeigt werden. Nach 6-wöchiger Behandlung mit  $\text{CCl}_4$  entwickelten CXCL4 *knockout* Mäuse eine schwächere Fibrose als die Wildtypkontrollen. Sie zeigten auch eine geringere Expression von profibrotischen Genen wie z.B. TGF- $\beta$  oder Col1 $\alpha$ 1. Ebenso war die Infiltration von neutrophilen Granulozyten und von CD8+ T-Zellen in die fibrotischen Lebern der CXCL4<sup>-/-</sup> Tiere geringer als bei den Wildtypen.

Basierend auf den Ergebnissen der *in vivo* Versuche wurden im Nachfolgenden die Effekte von CXCL4 *in vitro* analysiert.

### 3.3.2 CXCL4 induziert Migration und Proliferation *in vitro*

Auf Grund der besseren Verfügbarkeit muriner Sternzellen, wurden die *in vitro* Versuche wieder mit der GRX Sternzelllinie durchgeführt. Da Sternzellen selbst auch Chemokine sezernieren können, wurde in einem ersten Schritt überprüft, ob die GRX Zellen auch selbst das Chemokin CXCL4 produzieren.

Dafür wurde mittels ELISA die CXCL4 Konzentration im Überstand von verschiedenen stimulierten Sternzellen gemessen. Die Zellen wurden entweder mit 20 ng/ml TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) oder mit 20 ng/ml PDGF-B (platelet derived growth factor B) oder mit 2 ng/ml TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) stimuliert. Als Positivkontrolle dienten in diesem Fall mit Adrenalin aktivierte Thrombozyten.

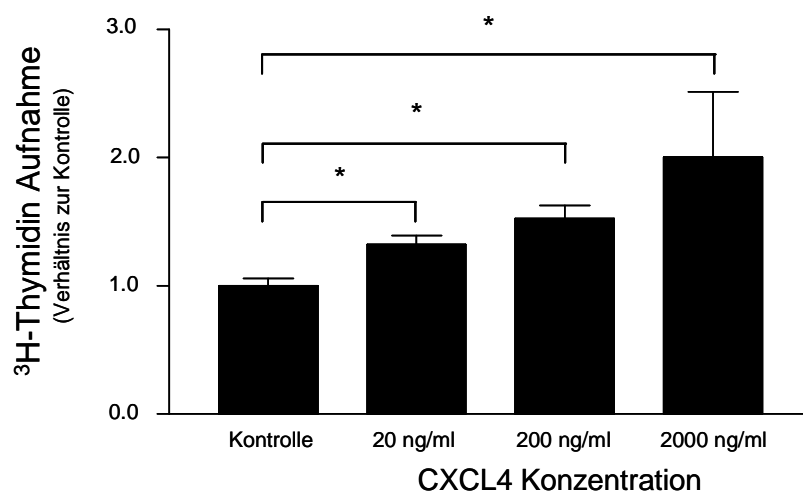


**Abb.43:** Quantifizierung der CXCL4 Proteinkonzentration im Überstand, der mit TGF- $\beta$ , PDGF-BB oder TNF- $\alpha$  stimulierten GRX Sternzellen. Als Positivkontrolle dienten aktivierte Thrombozyten.

Wie man der Abb. 43 entnehmen kann, führte die Stimulation mit den oben genannten Proteinen zu keiner messbaren Produktion des Chemokins CXCL4 in den Sternzellen, im Gegensatz zu den aktivierten Thrombozyten, welche enorme Mengen CXCL4 freisetzen.

Als nächstes wurden die direkten Effekte des Chemokin CXCL4 auf Sternzellen untersucht. Dafür wurden GRX Zellen mit unterschiedlichen Dosen rekombinanten CXCL4 stimuliert. Zuerst wurden die Proliferation und die Migration der Sternzellen analysiert, da diese zwei Faktoren die physiologische Reaktion auf eine Verletzung der Leber darstellen.

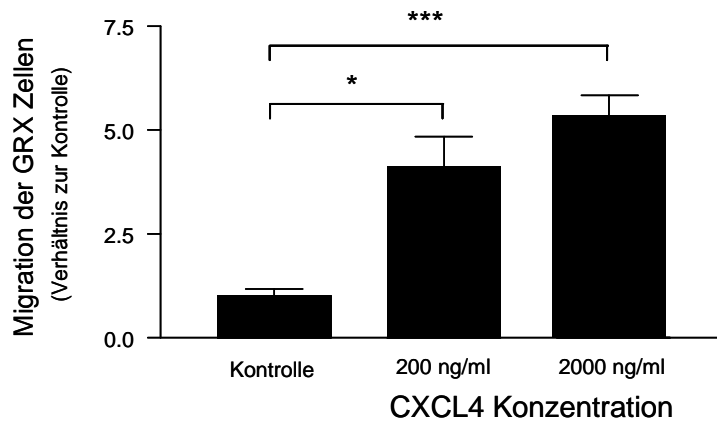
Die Stimulation der GRX Zellen mit CXCL4 führte zu einer gesteigerten Proliferation (Abb.44), welche durch die Quantifizierung, der Aufnahme von  $^3\text{H}$  Thymidin in die Zellen, ermittelt wurde. Während die Zellen proliferieren wird  $^3\text{H}$  Thymidin in die neu synthetisierte DNS eingebaut.



**Abb.44:** Quantifizierung der  $^3\text{H}$  Thymidin Aufnahme in die, mit den angegebenen Dosen rekombinanten CXCL4 stimulierten, GRX Sternzellen, \* =  $P < 0,05$

Schon eine relativ geringe Dosis von 20 ng/ml CXCL4 führte zu einer leichten, aber dennoch signifikanten Steigerung der Proliferation. Die Stimulation mit einer hohen Dosis rekombinanten CXCL4 (2000 ng/ml) resultierte in einer Verdoppelung der Proliferationsrate der GRX Zellen.

Ebenso förderte die Stimulation mit CXCL4 die Migration der GRX Zellen, wie man der Abbildung 45 entnehmen kann.

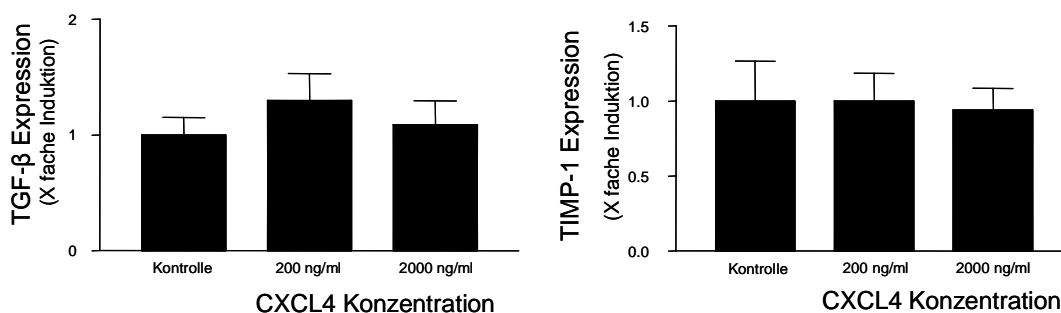


**Abb.45:** Quantifizierung der Migration von, mit den angegebenen Dosen rekombinatem CXCL4 stimulierten, GRX Sternzellen, \* =  $P < 0,05$ , \*\*\* =  $P < 0,001$

So stieg die Migration, nach der Stimulation mit einer Dosis von 200 ng/ml, signifikant um den Faktor 4, im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle. Die Erhöhung der Dosis auf 2000 ng/ml CXCL4 führte hingegen nur noch zu einer geringeren Steigerung der Migration auf das fünffache.

Weitere physiologische Reaktionen auf eine Verletzung der Leber, ist die gesteigerte Transkription von fibroserelevanten Genen, wie z.B. TGF- $\beta$  oder TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases 1) und die Produktion von Kollagen.

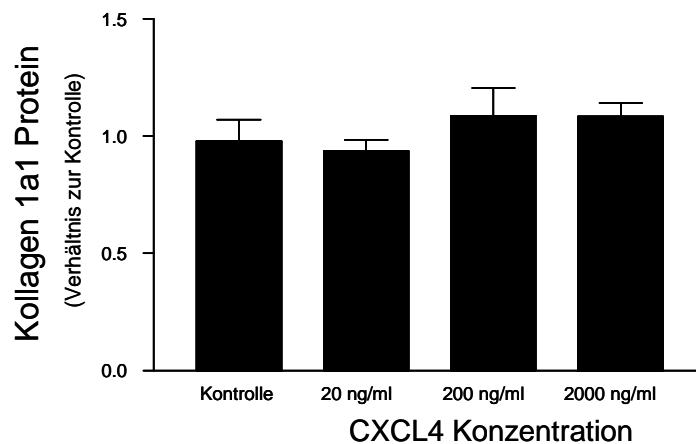
Die Stimulation der GRX Sternzelllinie mit rekombinatem CXCL4 hatte keinen Einfluss auf die Expression von TGF- $\beta$  und von TIMP-1 (Abb.46).



**Abb.46:** Durch RT-PCR ermittelte TGF- $\beta$  Expression (links) und TIMP-1 Expression (rechts) in den, mit den angegebenen Dosen rekombinaten CXCL4, stimulierten GRX Sternzellen.

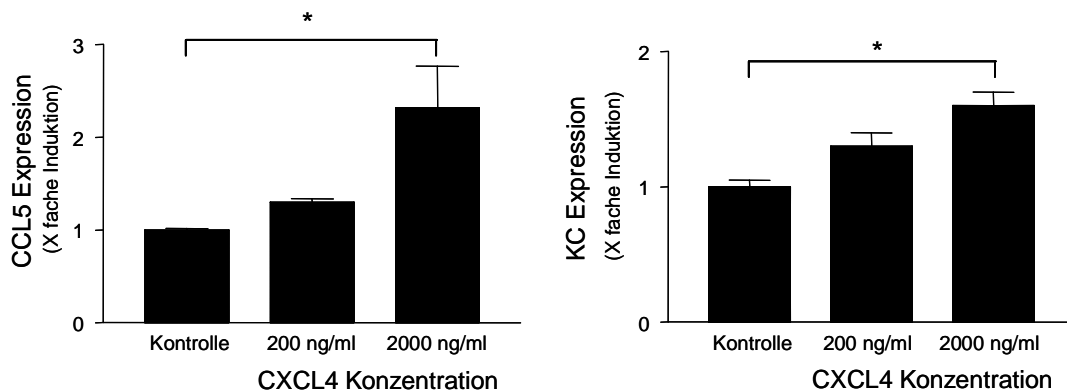
Ebenso hatte die Stimulation der GRX Zellen keine Einfluss auf die Kollagenproteinsynthese (Abb.47)





**Abb.47:** Durch Western Blot ermittelte Kollagenkonzentration in GRX Zellen nach der Stimulation mit der angegebenen Dosis rekombinatem CXCL4.

Basierend auf den *in vivo* Daten, welche Fr. Pauels erzielte, wurde abschließend die Expression der Chemokine CCL5 und KC, in den mit rekombinatem CXCL4 stimulierten GRX Zellen, gemessen. Diese Chemokine vermitteln effektiv die Rekrutierung von T-Zellen [45] bzw. von neutrophilen Granulozyten [17].



**Abb.48:** Durch RT-PCR ermittelte CCL5 Expression (links) und KC Expression (rechts) in den, mit den angegebenen Dosen rekombinatem CXCL4 stimulierten, GRX Sternzellen, \* =  $P < 0,05$

Wie man der Abbildung 48 entnehmen kann, führte die Stimulation der GRX Zellen mit einer Dosis von 200 ng/ml CXCL4 nur zu einer leichten, aber nicht signifikanten Steigerung der Expression der zwei Chemokine, wohingegen die

Stimulation mit einer Dosis von 2000 ng/ml die Expression des Chemokins CCL5 verdoppelte und die des Chemokins KC um den Faktor 1,5 erhöhte.

Zusammenfassend kann man sagen, dass während der HCV und NASH induzierten Fibrose die CXCL4 Konzentrationen erhöht sind.

Rekombinates CXCL4 induzierte *in vitro* die Proliferation und die Migration von murinen Sternzellen. Ebenso wurde die Chemokinproduktion der Sternzellen stimuliert.

Somit scheinen Thrombozyten und deren Hauptprodukt CXCL4 ebenfalls eine wichtige Rolle im Rahmen der Leberfibrose zu spielen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Akute Leberschädigung

Die im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit generierten Daten legen die Vermutung nahe, dass der Chemokinrezeptor CXCR3 eine positive Rolle, im Rahmen der durch Tetrachlorkohlenstoff induzierten akuten Leberschädigung, spielt. Ähnliche Effekte wurden für andere Schädigungsmodelle beschrieben. So wiesen CXCR3<sup>-/-</sup> Mäuse eine erhöhte Mortalitätsrate auf, nachdem diesen ConA injiziert wurde [109]. Im Gegensatz dazu zeigen andere *in vivo* Experimente, wie z.B. Ischämie Reperfusions Schädigung oder virale Leberschädigung, dass der Rezeptor negative Effekte vermittelt [43, 85]. Daher scheint die Wirkung des CXCR3 Rezeptors stark von der Art des Leberschadens abzuhängen.

In den hier beschriebenen Versuchen wurde ein akutes Schädigungsmodell verwendet, welches in einer Hepatozytennekrose und einer darauf folgender Infiltration von Leukozyten aus dem peripheren Blut resultiert [110-111]. Es ist bereits bekannt, dass die Injektion von CCl<sub>4</sub> zu einer starken Induktion des CXCR3 Liganden CXCL9 in der geschädigten Leber führt [64]. CXCL9 ist das wichtigste Chemokin, welches die Rekrutierung von NK- und NKT-Zellen vermittelt [77], indem es die Migration dieser Zellen aus dem Blut in die Leber fördert [112]. Da die CXCR3<sup>-/-</sup> Tiere anfälliger für schweren Leberschaden waren (Abb.4, Abb.5), wurde untersucht, ob dieser Phänotyp mit einer veränderten Rekrutierung der T-, NK- und NKT-Zellen einhergeht. Tatsächlich zeigten die verwendeten CXCR3<sup>-/-</sup> Mäuse eine verminderte Rekrutierung von NK- und NKT-Zellen in die Leber nach der toxischen Schädigung (Abb.7, Abb.8). Dieser Immun-Phänotyp stimmt mit früheren Ergebnissen überein [77] und bestätigt die Rolle der CXCR3 Liganden bei der Immunzellrekrutierung [94]. In einem akuten ConA induzierten Leberschädigungsmodell, konnte außerdem gezeigt werden, dass der Chemokinrezeptor CXCR3 eine funktionell wichtige Rolle spielt [109], indem er die Infiltration von regulatorischen T-Zellen in die Leber vermittelt [40]. Aber im Gegensatz zum ConA induzierten Schaden, ist

die Rolle der regulatorischen T-Zellen im CCl<sub>4</sub> Schädigungsmodell noch umstritten, da diese nur einen geringen Prozentsatz, der sich in der Leber befindlichen Leukozyten ausmachen [40]. Daher wurde diese Subpopulation in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht.

Einen weitaus größeren Anteil in der humanen und murinen Leber, machen die NK- und NKT-Zellen aus [113-114]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von NKT-Zellen den durch CCl<sub>4</sub> ausgelösten Schaden verstärkt [111]. Somit scheint die verringerte Anzahl von NKT-Zellen in den CXCR3<sup>-/-</sup> Tieren, im Vergleich zu den Wildtypmäußen, an dem verstärkt auftretendem Leberschaden funktionell beteiligt zu sein. Die andere Zellpopulation, welche in den CXCR3<sup>-/-</sup> Mäusen extrem reduziert war, war die der NK-Zellen. Von diesen Zellen weiß man, dass sie eine wichtige Rolle während der Leberschädigung spielen [115], da sie in den leberresidenten Zellen Apoptose induzieren können [37, 116]. Da aber deren Funktionen im Rahmen der akuten CCl<sub>4</sub> induzierten Leberschädigung noch nicht geklärt sind, wurde diese Zellpopulation genauer untersucht. Deshalb wurden mit Hilfe des anti-*mouse* ASIALO GM1 Antikörpers die NK-Zellen in Wildtypmäusen, vor Auslösung des Leberschadens, depletiert. Die Injektion von Tetrachlorkohlenstoff führte in den so behandelten Tieren zu einem verstärkten Leberschaden, welcher durch die erhöhten Serumtransaminasen (Abb.14) und auch durch die histologischen Untersuchungen (Abb.15) gezeigt wird.

Trotz des Fehlens des Rezeptors, waren die CXCR3<sup>-/-</sup> Tiere in der Lage NK-Zellen, mit zeitlicher Verzögerung, zu rekrutieren (Abb.8). Dies könnte durch die Rezeptoren CCR1 und CCR5 vermittelt worden sein, da NK-Zellen auch diese Rezeptoren exprimieren [28, 104] und die Expression der korrespondierenden Liganden erhöht war (Abb.9, Abb.10).

Um diesen Sachverhalt genauer zu klären, wurden zusätzlich CCR1<sup>-/-</sup> und CCR5<sup>-/-</sup> Tiere mit CCl<sub>4</sub> behandelt. Der Abbildung 9 kann man entnehmen, dass diese zwei *knockout* Maustämme, im Gegensatz zu den CXCR3<sup>-/-</sup> Mäusen, keinen verstärkten Leberschaden aufweisen. Ebenso waren diese in der Lage, NK-Zellen, ähnlich wie die Wildtypmäuse, in die geschädigte Leber zu rekrutieren (Abb.12).

Somit scheint das Fehlen von NK-Zellen bzw. die verminderte Rekrutierung dieser Zellpopulation zum Ort der Schädigung, nachteilig in diesem CCl<sub>4</sub> induziertem Schädigungsmodell zu sein.

Eine wichtige Funktion der NK-Zellen ist die Induktion von Apoptose in geschädigten Zellen [116]. Zur Quantifizierung der Apoptoserate wurde eine so genannte TUNEL Färbung durchgeführt, mit welcher man die während der Apoptose auftretenden DNS Doppelstrangbrüche detektieren kann [108]. Wie man der Abbildung 20 entnehmen kann, hatten die CXCR3<sup>-/-</sup> Tiere, 24h und 72h nach der CCl<sub>4</sub> Injektion eine geringere Apoptoserate als die Wildtypiere. Da die CXCR3 *knockout* Mäuse aber einen stärkeren Leberschaden aufwiesen, schien dieser Schaden nekrotischer Natur zu sein. Diese Hypothese wurde durch die höheren HMGB1 Konzentrationen in den geschädigten Lebern der CXCR3<sup>-/-</sup> Tieren unterstützt (Abb.21). Das Protein HMGB1 wird von nekrotischen Hepatozyten [117] freigesetzt und induziert in anderen leberresidenten Zellen die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen [17], was dann wiederum zu einer vermehrten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten führt [118]. Dieser Mechanismus konnte auch in den CXCR3<sup>-/-</sup> Tieren beobachtet werden. Die erhöhte HMGB1 Konzentration (Abb.21) führte zu einer gestiegenen intrahepatischen Konzentration des Zytokins KC (Abb.23) und schlussendlich zu einer vermehrten Rekrutierung neutrophiler Granulozyten (Abb.14, Abb.15), welche den schon vorhandenen Schaden verstärkten.

Die Schlüsselrolle der neutrophilen Granulozyten während der Leberschädigung konnte auch schon mittels eines Ischämie-Reperfusion Modells [21], im Rahmen einer alkoholischen Hepatitis [22] und bei der Intoxikation mit Paracetamol [23] nachgewiesen werden. Bei dem zuletzt genannten Modell korrelierte der Leberschaden mit der HMGB1 Konzentration und der daraus resultierenden Infiltration von neutrophilen Granulozyten in die Leber. Eine Neutralisierung des HMGB1 Proteins, mittels eines Antikörpers, verringerte die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten [117]. Dieser Mechanismus scheint aber nicht leberspezifisch zu sein, da ähnliche Ergebnisse auch in einem Modell akuter Lungenschädigung [119] erzielt wurden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Chemokinrezeptor CXCR3 essentiell für die Rekrutierung von NK- und NKT-Zellen während der akuten CCl<sub>4</sub> induzierten Leberschädigung ist. Die verringerte Anzahl dieser Zellen geht mit einem verstärkten nekrotischen Schaden und somit mit einer erhöhten intrahepatischen HMGB1 Konzentration einher. Dies führt zu einer Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die geschädigte Leber, wo diese dann den Schaden verstärken.

## 4.2 Chronische Leberschädigung

Basierend auf den Ergebnissen der akuten Leberschädigung, wurde in den CXCR3 *knockout* Tieren mittels zweier unabhängiger Modelle eine Leberfibrose ausgelöst. Die Tiere entwickelten eine stärkere Fibrose als die gleich behandelten Wildtyp-Kontrollen (Abb.24-Abb.29). Dies war nicht unerwartet, da ähnliche Ergebnisse bei CXCR3<sup>-/-</sup> Tieren erzielt wurden, bei welchen eine Lungenfibrose [94] oder auch eine Nierenfibrose [93] induziert worden war. Die verstärkt auftretende Leberfibrose ging mit einer reduzierten Infiltration von IFN- $\gamma$  positiven T-Zellen und auch mit einer reduzierten IFN- $\gamma$  Expression einher (Abb.30, Abb.31). Die daraus resultierende TH2 assoziierte, profibrogene Umgebung wurde auch in den zwei oben erwähnten Modellen beschrieben [93-94].

Frühere Studien haben gezeigt, dass bei Mäusen der Cxc Chemokincluster mit experimenteller Fibrose gekoppelt ist [120]. Aus diesem Grund wurde die Expression der 3 Liganden des Chemokinrezeptors CXCR3 in fibrotischen Lebern von BALB/cL und A/J Mäusen gemessen. Interessanterweise war die Protein und RNS Expression des Chemokins CXCL9 in dem fibroresistenten Stamm am höchsten (Abb.33). Daher liegt die Vermutung nah, dass das Chemokin CXCL9, welches auch von Hepatozyten [5] und Endothelzellen [112] gebildet wird, eine antifibrotische Wirkung hat. Ebenso konnte gezeigt werden, dass CXCL9 im Rahmen einer Virus induzierten Encephalitis und Hepatitis eine protektive Rolle hat [70, 121].

Aus diesem Grund wurden die intrahepatische CXCL9 Expression und die CXCL9 Serumkonzentration in humanen Proben analysiert und mit den Fibrorestadien korreliert. Man kann eine deutliche Steigerung der intrahepatischen CXCL9 Expression mit fortschreitender Fibrose erkennen (Abb.33, Abb.35), welches auch immunhistochemisch bestätigt wurde (Abb.34). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* Stimulation der humanen Sternzelllinie LX-2 mit rekombinantem IFN- $\gamma$  zu einer drastischen Expressionssteigerung von CXCL9 führt (Abb.36). Im Gegenzug dazu resultierte die *in vitro* Stimulation der LX-2 Zellen mit rekombinantem CXCL9 in einer geringeren Expression von Kollagen, was auch auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte (Abb.37). Somit scheint CXCL9, zumindest *in vitro*, antifibrotische Effekte zu haben.

Diese Ergebnisse erscheinen auf den ersten Blick paradox. Während die antifibrotischen Effekte von IFN- $\gamma$  und den damit zusammenhängenden Signalwegen bewiesen sind [122], ist der Sachverhalt beim Menschen noch unklar. Eine große Interventionsstudie mit IFN- $\gamma$ , zur Reduzierung einer HCV induzierten Fibrose konnte keine positiven Effekte zeigen [123]. Ebenso ist es schwierig zu erklären, warum das antifibrotische Chemokin CXCL9 bei den höheren Fibrorestadien vermehrt exprimiert wird. Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass die direkten antifibrotischen Effekte von CXCL9 auf die Sternzellen, durch eine verstärkte Infiltration von inflammatorischen Zellen wieder aufgehoben werden und somit zu einer verstärkten Fibrose führen. Eine weiterer möglicher Grund dafür könnte die unterschiedliche Empfindlichkeit von Menschen und Mäusen auf IFN- $\gamma$  sein. Dies könnte auf die verschiedene Expression der CXCR3 Isoformen, in beiden Spezies, zurückgeführt werden [67, 124].

Zur genaueren Klärung dieses Sachverhaltes sind fortführende Untersuchungen notwendig.

Zusammenfassend kann man sagen, dass das Chemokin CXCL9 und dessen Rezeptor CXCR3 wichtige Regulatoren der murinen Leberfibrose und der HCV induzierten Leberfibrose im Menschen darstellen. CXCR3 *knockout* Mäuse

entwickeln, im Vergleich zu Wildtypmäusen, eine starke Fibrose, welche mit einer reduzierten Infiltration von IFN- $\gamma$  produzierenden T-Zellen einhergeht. Bei der humanen HCV induzierten Leberfibrose steigt die Konzentration des Chemokins CXCL9 mit fortschreitender Fibrose an. Mittels *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass das Chemokin CXCL9 antifibrotische Effekte in Sternzellen vermittelt.

### 4.3 Das Chemokin CXCL4

Wie oben schon erwähnt, sind Thrombozyten eine der Hauptquellen für das Chemokin CXCL4 [59]. Während die Rolle der Thrombozyten bei der Blutgerinnung bekannt ist, deuten neuere Ergebnisse darauf hin, dass diese auch einen Einfluss auf die Leberschädigung haben [99, 125], da sie mit als erstes zum Ort der Schädigung rekrutiert werden. Anschließend sezernieren die aktivierten Thrombozyten verschiedene Proteine, wie z.B. PDGF oder TGF- $\beta$  [31], welche bekanntermaßen die Fibrogenese beeinflussen. Dies konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (Abb.41, Abb.42). So befinden sich die aktivierten Thrombozytenaggregate in direkter Nähe zu den Kollagenfibrillen.

Als nächstes wurde überprüft, ob die Rekrutierung der Thrombozyten, im Rahmen der Fibrose, auch zu einer Steigerung der CXCL4 Konzentration führt. Dazu wurde die CXCL4 Serumkonzentration in Relation zur Schwere der Fibrose analysiert. Tatsächlich war die CXCL4 Konzentration im peripheren Blut bei Patienten mit fortgeschrittener Fibrose (F2/F3) im Vergleich zu gesunden Patienten signifikant erhöht (Abb.38). Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei Patienten mit viraler Hepatitis gefunden [102]. Ein wichtiger Punkt bei diesen Untersuchungen war, dass Proben von Patienten mit sehr schwerer Fibrose (F4) oder Zirrhose nicht analysiert wurden, da diese in den meisten Fällen eine reduzierte Anzahl von Thrombozyten aufweisen [126]. Ebenso hatten Patienten mit einer fortgeschrittenen Fibrose eine signifikant höhere intrahepatische CXCL4 Expression als die gesunden Kontrollen (Abb.39). Dies ist auf den ersten Blick überraschend, da Thrombozyten keinen Zellkern besitzen [53] und



somit keine reguläre Transkription durchführen können. Thrombozyten enthalten aber mRNA Kopien, was sie zu einer begrenzten Translation befähigt [54-55]. Da die Thrombozyten in die geschädigte Leber einwandern, erhöht sich somit auch die intrahepatische CXCL4 mRNA Konzentration.

Zusätzlich wurden auch noch Proben von Patienten mit nicht alkoholischer Steatohepatitis hinsichtlich der CXCL4 Expression untersucht. Auch hier war die intrahepatische CXCL4 Expression signifikant erhöht (Abb.40). Diese Daten passen auch zu neueren Ergebnissen bei denen in Patienten mit alkoholischer Hepatitis eine erhöhte CXCL4 Expression in den geschädigten Lebern nachgewiesen werden konnte [101]. Auf Grund dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass das Chemokin CXCL4 eine wichtige Rolle bei Lebererkrankungen, unterschiedlichen Ursprungs, spielt.

Als nächstes wurden die direkten Effekte des Chemokins CXCL4 auf die Sternzellen *in vitro* untersucht, da diese Zellen eine Hauptrolle während der Fibrosierung haben. Die Stimulation von murinen Sternzellen mit rekombinatem CXCL4 führte zu keiner signifikanten Änderung in der Kollagensynthese (Abb.47) oder auch der Expression von fibroserelevanten Genen wie TGF- $\beta$  und TIMP-1 (Abb.46). Im Gegensatz dazu war die Proliferation (Abb.44) und die Migration (Abb.45) der GRX Zellen, nach der Stimulation mit CXCL4, signifikant erhöht, welche wichtige Ereignisse im Rahmen der Sternzellaktivierung sind [127]. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch schon für andere profibrogene Chemokine, wie z.B. CCL3 [128] oder auch CCL21 [129] beschrieben.

Eine weitere Funktion der Sternzellen ist die Regulation der Migration von Leukozyten in die Leber [130]. Die Stimulation der murinen GRX Sternzelllinie mit rekombinatem CXCL4 führte zu einer signifikanten Steigerung der Expression von CCL5 und von KC (Abb.48). Beide Chemokine können die Rekrutierung von Immunzellen vermitteln [41] [17]. Basierend auf diesen Beobachtungen, lässt sich folgende Hypothese aufstellen: Die aktivierten Sternzellen sezernieren Chemokine, welche Immunzellen in die Leber rekrutieren. Diese wiederum führen zu einer stärkeren Aktivierung der Sternzellen und somit zu einer verstärkten Kollagensynthese.

Die Produktion des Chemokins CCL5 durch die Sternzellen scheint besonders wichtig, da das Chemokin CXCL4 mit dem Chemokin CCL5 interagieren kann. Es bilden sich so genannte Heterodimere, wobei die CCL5 vermittelten Effekte auf Immunzellen verstärkt werden [82-83]. Diese Interaktion sollte genauer untersucht werden, da diese vor kurzem erfolgreich *in vivo* gehemmt werden konnte [83] und man somit einer möglichen Therapie einen Schritt näher gekommen ist.

Zusammenfassend kann man sagen, dass das Chemokin CXCL4 und somit auch Thrombozyten, bei chronischen Lebererkrankungen involviert sind, wobei der Ursache der Schädigung ein Nebenaspekt zu sein scheint. So konnte bei der HCV induzierten Fibrose gezeigt werden, dass Thrombozyten sich in direkter Nähe von Kollagenfasern befinden. Außerdem stieg die CXCL4 Konzentration mit fortschreitender Fibrose an. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass dieses Chemokin profibrogene Effekte *in vitro* aufweist.

Aber zur genaueren Charakterisierung des Chemokins CXCL4 sind noch weitere Untersuchungen notwendig.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Dong, Z., et al., *The roles of innate immune cells in liver injury and regeneration*. Cell Mol Immunol, 2007. **4**(4): p. 241-52.
2. Mowat, A.M., *Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(4): p. 331-41.
3. Ramadori, G., et al., *Physiology and pathophysiology of liver inflammation, damage and repair*. J Physiol Pharmacol, 2008. **59 Suppl 1**: p. 107-17.
4. Sheikh, N., et al., *Cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 is released by the noninjured liver in a rat acute-phase model*. Lab Invest, 2006. **86**(8): p. 800-14.
5. Ren, X., A. Kennedy, and L.M. Colletti, *CXC chemokine expression after stimulation with interferon-gamma in primary rat hepatocytes in culture*. Shock, 2002. **17**(6): p. 513-20.
6. Li, X., et al., *Critical role of CXC chemokines in endotoxemic liver injury in mice*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(3): p. 443-52.
7. Marra, F., et al., *Differential requirement of members of the MAPK family for CCL2 expression by hepatic stellate cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **287**(1): p. G18-26.
8. Schwabe, R.F., R. Bataller, and D.A. Brenner, *Human hepatic stellate cells express CCR5 and RANTES to induce proliferation and migration*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **285**(5): p. G949-58.

9. Wasmuth, H.E., F. Tacke, and C. Trautwein, *Chemokines in liver inflammation and fibrosis*. Semin Liver Dis, 2010. **30**(3): p. 215-25.
10. Saile, B. and G. Ramadori, *Inflammation, damage repair and liver fibrosis--role of cytokines and different cell types*. Z Gastroenterol, 2007. **45**(1): p. 77-86.
11. Wick, M.J., F. Leithauser, and J. Reimann, *The hepatic immune system*. Crit Rev Immunol, 2002. **22**(1): p. 47-103.
12. Sheth, K. and P. Bankey, *The liver as an immune organ*. Curr Opin Crit Care, 2001. **7**(2): p. 99-104.
13. Racanelli, V. and B. Rehermann, *The liver as an immunological organ*. Hepatology, 2006. **43**(2 Suppl 1): p. S54-62.
14. Erhardt, A. and G. Tiegs, *Tolerance induction in response to liver inflammation*. Dig Dis, 2010. **28**(1): p. 86-92.
15. Crispe, I.N., *The liver as a lymphoid organ*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 147-63.
16. Narni-Mancinelli, E., et al., *Inflammatory monocytes and neutrophils are licensed to kill during memory responses in vivo*. PLoS Pathog, 2011. **7**(12): p. e1002457.
17. Ramaiah, S.K. and H. Jaeschke, *Role of neutrophils in the pathogenesis of acute inflammatory liver injury*. Toxicol Pathol, 2007. **35**(6): p. 757-66.
18. Jaeschke, H. and T. Hasegawa, *Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury*. Liver Int, 2006. **26**(8): p. 912-9.

19. Bajt, M.L., A. Farhood, and H. Jaeschke, *Effects of CXC chemokines on neutrophil activation and sequestration in hepatic vasculature*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **281**(5): p. G1188-95.
20. Jaeschke, H., *Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **290**(6): p. G1083-8.
21. Jaeschke, H., A. Farhood, and C.W. Smith, *Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo*. FASEB J, 1990. **4**(15): p. 3355-9.
22. Bautista, A.P., *Neutrophilic infiltration in alcoholic hepatitis*. Alcohol, 2002. **27**(1): p. 17-21.
23. Liu, Z.X., et al., *Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity*. Hepatology, 2006. **43**(6): p. 1220-30.
24. Wu, Z., et al., *Acute liver failure: mechanisms of immune-mediated liver injury*. Liver Int, 2010. **30**(6): p. 782-94.
25. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets*. Trends Immunol, 2001. **22**(11): p. 633-40.
26. Smart, Y.C., et al., *Expression of natural killer (NK) cell-specific alloantigens on a mouse NK-like cell line*. Immunol Cell Biol, 1989. **67** (Pt 4): p. 239-42.
27. Biron, C.A., et al., *Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 189-220.

28. Bernardini, G., et al., *CCL3 and CXCL12 regulate trafficking of mouse bone marrow NK cell subsets*. Blood, 2008. **111**(7): p. 3626-34.
29. Vivier, E., et al., *Functions of natural killer cells*. Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 503-10.
30. Martin-Fontecha, A., et al., *Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming*. Nat Immunol, 2004. **5**(12): p. 1260-5.
31. Henderson, N.C. and J.P. Iredale, *Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution*. Clin Sci (Lond), 2007. **112**(5): p. 265-80.
32. Guidotti, L.G. and F.V. Chisari, *Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 65-91.
33. Ahlenstiel, G., et al., *Distinct KIR/HLA compound genotypes affect the kinetics of human antiviral natural killer cell responses*. J Clin Invest, 2008. **118**(3): p. 1017-26.
34. Parham, P., *MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(3): p. 201-14.
35. Ljunggren, H.G. and K. Karre, *In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition*. Immunol Today, 1990. **11**(7): p. 237-44.
36. Robertson, M.J., *Role of chemokines in the biology of natural killer cells*. J Leukoc Biol, 2002. **71**(2): p. 173-83.
37. Melhem, A., et al., *Anti-fibrotic activity of NK cells in experimental liver injury through killing of activated HSC*. J Hepatol, 2006. **45**(1): p. 60-71.

38. Zou, Y., et al., *Increased killing of liver NK cells by Fas/Fas ligand and NKG2D/NKG2D ligand contributes to hepatocyte necrosis in virus-induced liver failure*. J Immunol, 2010. **184**(1): p. 466-75.
39. Doherty, D.G. and C. O'Farrelly, *Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver*. Immunol Rev, 2000. **174**: p. 5-20.
40. Santodomingo-Garzon, T., et al., *Natural killer T cells regulate the homing of chemokine CXCR3-positive regulatory T cells to the liver in mice*. Hepatology, 2009. **49**(4): p. 1267-76.
41. Ajuebor, M.N., et al., *CCR5 deficiency drives enhanced natural killer cell trafficking to and activation within the liver in murine T cell-mediated hepatitis*. Am J Pathol, 2007. **170**(6): p. 1975-88.
42. Luster, A.D., *Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation*. N Engl J Med, 1998. **338**(7): p. 436-45.
43. Zhai, Y., et al., *CXCR3+CD4+ T cells mediate innate immune function in the pathophysiology of liver ischemia/reperfusion injury*. J Immunol, 2006. **176**(10): p. 6313-22.
44. Kim, C.H., B. Johnston, and E.C. Butcher, *Trafficking machinery of NKT cells: shared and differential chemokine receptor expression among V alpha 24(+)V beta 11(+) NKT cell subsets with distinct cytokine-producing capacity*. Blood, 2002. **100**(1): p. 11-6.
45. Akashi, S., et al., *A novel small-molecule compound targeting CCR5 and CXCR3 prevents acute and chronic allograft rejection*. Transplantation, 2005. **80**(3): p. 378-84.

46. Dufour, J.H., et al., *IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking*. J Immunol, 2002. **168**(7): p. 3195-204.
47. Gao, B., S. Radaeva, and O. Park, *Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(3): p. 513-28.
48. Doherty, D.G., et al., *The human liver contains multiple populations of NK cells, T cells, and CD3+CD56+ natural T cells with distinct cytotoxic activities and Th1, Th2, and Th0 cytokine secretion patterns*. J Immunol, 1999. **163**(4): p. 2314-21.
49. Mita, E., et al., *Role of Fas ligand in apoptosis induced by hepatitis C virus infection*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **204**(2): p. 468-74.
50. Tschopp, J. and M. Nabholz, *Perforin-mediated target cell lysis by cytolytic T lymphocytes*. Annu Rev Immunol, 1990. **8**: p. 279-302.
51. Huang, L., et al., *The liver eliminates T cells undergoing antigen-triggered apoptosis in vivo*. Immunity, 1994. **1**(9): p. 741-9.
52. Bertolino, P., G. Klimpel, and S.M. Lemon, *Hepatic inflammation and immunity: a summary of a conference on the function of the immune system within the liver*. Hepatology, 2000. **31**(6): p. 1374-8.
53. Italiano, J.E., Jr. and R.A. Shivdasani, *Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(6): p. 1174-82.
54. Davi, G. and C. Patrono, *Platelet activation and atherothrombosis*. N Engl J Med, 2007. **357**(24): p. 2482-94.



55. Healy, A.M., et al., *Platelet expression profiling and clinical validation of myeloid-related protein-14 as a novel determinant of cardiovascular events*. *Circulation*, 2006. **113**(19): p. 2278-84.
56. Nieswandt, B., et al., *Acute systemic reaction and lung alterations induced by an antiplatelet integrin gpIIb/IIIa antibody in mice*. *Blood*, 1999. **94**(2): p. 684-93.
57. Massaguer, A., et al., *Production and characterization of monoclonal antibodies against conserved epitopes of P-selectin (CD62P)*. *Tissue Antigens*, 2000. **56**(2): p. 117-28.
58. Schror, K., *[Pathophysiology of platelet activation and pharmacology of GPIIb/IIIa inhibitors]*. *Herz*, 2001. **26 Suppl 1**: p. 30-5.
59. Gleissner, C.A., P. von Hundelshausen, and K. Ley, *Platelet chemokines in vascular disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(11): p. 1920-7.
60. Deuel, T.F., et al., *Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. **78**(7): p. 4584-7.
61. Ludwig, A., et al., *The CXC-chemokine neutrophil-activating peptide-2 induces two distinct optima of neutrophil chemotaxis by differential interaction with interleukin-8 receptors CXCR-1 and CXCR-2*. *Blood*, 1997. **90**(11): p. 4588-97.
62. Shiozawa, F., et al., *Enhanced expression of interferon-inducible protein 10 associated with Th1 profiles of chemokine receptor in autoimmune pulmonary inflammation of MRL/lpr mice*. *Arthritis Res Ther*, 2004. **6**(1): p. R78-R86.

63. Keeley, E.C., B. Mehrad, and R.M. Strieter, *Chemokines as mediators of neovascularization*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(11): p. 1928-36.
64. Berres, M.L., et al., *The chemokine scavenging receptor D6 limits acute toxic liver injury in vivo*. *Biol Chem*, 2009. **390**(10): p. 1039-45.
65. Morales-Ibanez, O. and R. Bataller, *Platelet-derived chemokines: new targets to treat liver fibrosis*. *J Hepatol*, 2011. **54**(3): p. 581-3.
66. Lacotte, S., et al., *CXCR3, inflammation, and autoimmune diseases*. *Ann N Y Acad Sci*, 2009. **1173**: p. 310-7.
67. Lasagni, L., et al., *An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4*. *J Exp Med*, 2003. **197**(11): p. 1537-49.
68. Sachais, B.S., et al., *Elimination of platelet factor 4 (PF4) from platelets reduces atherosclerosis in C57Bl/6 and apoE<sup>-/-</sup> mice*. *Thromb Haemost*, 2007. **98**(5): p. 1108-13.
69. Soto, H., et al., *The CC chemokine 6Ckine binds the CXC chemokine receptor CXCR3*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(14): p. 8205-10.
70. Hokeness, K.L., et al., *CXCR3-dependent recruitment of antigen-specific T lymphocytes to the liver during murine cytomegalovirus infection*. *J Virol*, 2007. **81**(3): p. 1241-50.
71. Curbishley, S.M., et al., *CXCR 3 activation promotes lymphocyte transendothelial migration across human hepatic endothelium under fluid flow*. *Am J Pathol*, 2005. **167**(3): p. 887-99.

72. Bonacchi, A., et al., *Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes*. J Biol Chem, 2001. **276**(13): p. 9945-54.
73. Nelson, T.E. and D.L. Gruol, *The chemokine CXCL10 modulates excitatory activity and intracellular calcium signaling in cultured hippocampal neurons*. J Neuroimmunol, 2004. **156**(1-2): p. 74-87.
74. Romagnani, P., et al., *Cell cycle-dependent expression of CXC chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity*. J Clin Invest, 2001. **107**(1): p. 53-63.
75. Salmaggi, A., et al., *Expression and modulation of IFN-gamma-inducible chemokines (IP-10, Mig, and I-TAC) in human brain endothelium and astrocytes: possible relevance for the immune invasion of the central nervous system and the pathogenesis of multiple sclerosis*. J Interferon Cytokine Res, 2002. **22**(6): p. 631-40.
76. Suyama, T., et al., *Up-regulation of the interferon gamma (IFN-gamma)-inducible chemokines IFN-inducible T-cell alpha chemoattractant and monokine induced by IFN-gamma and of their receptor CXC receptor 3 in human renal cell carcinoma*. Cancer, 2005. **103**(2): p. 258-67.
77. Johnston, B., et al., *Differential chemokine responses and homing patterns of murine TCR alpha beta NKT cell subsets*. J Immunol, 2003. **171**(6): p. 2960-9.
78. Keane, M.P., et al., *IFN-gamma-inducible protein-10 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibition of angiogenesis*. J Immunol, 1999. **163**(10): p. 5686-92.

79. Burdick, M.D., et al., *CXCL11 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibition of vascular remodeling*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **171**(3): p. 261-8.
80. Gear, A.R. and D. Camerini, *Platelet chemokines and chemokine receptors: linking hemostasis, inflammation, and host defense*. Microcirculation, 2003. **10**(3-4): p. 335-50.
81. Scheuerer, B., et al., *The CXC-chemokine platelet factor 4 promotes monocyte survival and induces monocyte differentiation into macrophages*. Blood, 2000. **95**(4): p. 1158-66.
82. von Hundelshausen, P., et al., *Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium*. Blood, 2005. **105**(3): p. 924-30.
83. Koenen, R.R., et al., *Disrupting functional interactions between platelet chemokines inhibits atherosclerosis in hyperlipidemic mice*. Nat Med, 2009. **15**(1): p. 97-103.
84. Fiorina, P., et al., *Role of CXC chemokine receptor 3 pathway in renal ischemic injury*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(3): p. 716-23.
85. Ajuebor, M.N., et al., *GammadeltaT cells initiate acute inflammation and injury in adenovirus-infected liver via cytokine-chemokine cross talk*. J Virol, 2008. **82**(19): p. 9564-76.
86. Hou, X., et al., *NKG2D-retinoic acid early inducible-1 recognition between natural killer cells and Kupffer cells in a novel murine natural killer cell-dependent fulminant hepatitis*. Hepatology, 2009. **49**(3): p. 940-9.

87. Strick-Marchand, H., et al., *Lymphocytes support oval cell-dependent liver regeneration*. J Immunol, 2008. **181**(4): p. 2764-71.
88. Pircher, A., M. Medinger, and J. Drevs, *Liver cancer: Targeted future options*. World J Hepatol, 2011. **3**(2): p. 38-44.
89. Liu, Y.Q., et al., *Desensitization of T lymphocyte function by CXCR3 ligands in human hepatocellular carcinoma*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(2): p. 164-70.
90. Shi, M., et al., [*Expression of CXCR3 in hepatocellular carcinoma*]. Ai Zheng, 2006. **25**(10): p. 1232-7.
91. Bukowski, R.M., et al., *Interferon-gamma and CXC chemokine induction by interleukin 12 in renal cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(10): p. 2780-9.
92. Tannenbaum, C.S., et al., *The CXC chemokines IP-10 and Mig are necessary for IL-12-mediated regression of the mouse RENCA tumor*. J Immunol, 1998. **161**(2): p. 927-32.
93. Nakaya, I., et al., *Blockade of IP-10/CXCR3 promotes progressive renal fibrosis*. Nephron Exp Nephrol, 2007. **107**(1): p. e12-21.
94. Jiang, D., et al., *Regulation of pulmonary fibrosis by chemokine receptor CXCR3*. J Clin Invest, 2004. **114**(2): p. 291-9.
95. Hintermann, E., et al., *CXCL10 promotes liver fibrosis by prevention of NK cell mediated hepatic stellate cell inactivation*. J Autoimmun, 2010. **35**(4): p. 424-35.
96. Radaeva, S., et al., *Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-*

- 
- related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. Gastroenterology*, 2006. **130**(2): p. 435-52.
97. Iannacone, M., et al., *Platelets mediate cytotoxic T lymphocyte-induced liver damage. Nat Med*, 2005. **11**(11): p. 1167-9.
98. Lang, P.A., et al., *Aggravation of viral hepatitis by platelet-derived serotonin. Nat Med*, 2008. **14**(7): p. 756-61.
99. Lesurtel, M., et al., *Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. Science*, 2006. **312**(5770): p. 104-7.
100. Pitsilos, S., et al., *Platelet factor 4 localization in carotid atherosclerotic plaques: correlation with clinical parameters. Thromb Haemost*, 2003. **90**(6): p. 1112-20.
101. Dominguez, M., et al., *Hepatic expression of CXC chemokines predicts portal hypertension and survival in patients with alcoholic hepatitis. Gastroenterology*, 2009. **136**(5): p. 1639-50.
102. Panasiuk, A., et al., *Activation of blood platelets in chronic hepatitis and liver cirrhosis P-selectin expression on blood platelets and secretory activity of beta-thromboglobulin and platelet factor-4. Hepatogastroenterology*, 2001. **48**(39): p. 818-22.
103. Hancock, W.W., et al., *Requirement of the chemokine receptor CXCR3 for acute allograft rejection. J Exp Med*, 2000. **192**(10): p. 1515-20.
104. Khan, I.A., et al., *CCR5 is essential for NK cell trafficking and host survival following Toxoplasma gondii infection. PLoS Pathog*, 2006. **2**(6): p. e49.

105. Barkhausen, T., et al., *Depletion of NK cells in a murine polytrauma model is associated with improved outcome and a modulation of the inflammatory response*. Shock, 2008. **30**(4): p. 401-10.
106. Shen, K., et al., *Activation of innate immunity (NK/IFN-gamma) in rat allogeneic liver transplantation: contribution to liver injury and suppression of hepatocyte proliferation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008. **294**(4): p. G1070-7.
107. Scaffidi, P., T. Misteli, and M.E. Bianchi, *Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation*. Nature, 2002. **418**(6894): p. 191-5.
108. Gavrieli, Y., Y. Sherman, and S.A. Ben-Sasson, *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation*. J Cell Biol, 1992. **119**(3): p. 493-501.
109. Erhardt, A., et al., *CXCR3 deficiency exacerbates liver disease and abrogates tolerance in a mouse model of immune-mediated hepatitis*. J Immunol, 2011. **186**(9): p. 5284-93.
110. Kovalovich, K., et al., *Increased toxin-induced liver injury and fibrosis in interleukin-6-deficient mice*. Hepatology, 2000. **31**(1): p. 149-59.
111. Lisbonne, M., et al., *Invariant natural killer T-cell-deficient mice display increased CCl<sub>4</sub>-induced hepatitis associated with CXCL1 over-expression and neutrophil infiltration*. Eur J Immunol, 2011. **41**(6): p. 1720-32.
112. Schrage, A., et al., *Enhanced T cell transmigration across the murine liver sinusoidal endothelium is mediated by transcytosis and surface presentation of chemokines*. Hepatology, 2008. **48**(4): p. 1262-72.

113. Knolle, P.A. and G. Gerken, *Local control of the immune response in the liver*. Immunol Rev, 2000. **174**: p. 21-34.
114. Matsuda, J.L., et al., *Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers*. J Exp Med, 2000. **192**(5): p. 741-54.
115. Beraza, N., et al., *Hepatocyte-specific NEMO deletion promotes NK/NKT cell- and TRAIL-dependent liver damage*. J Exp Med, 2009. **206**(8): p. 1727-37.
116. Ochi, M., et al., *Liver NK cells expressing TRAIL are toxic against self hepatocytes in mice*. Hepatology, 2004. **39**(5): p. 1321-31.
117. Antoine, D.J., et al., *Diet restriction inhibits apoptosis and HMGB1 oxidation and promotes inflammatory cell recruitment during acetaminophen hepatotoxicity*. Mol Med, 2010. **16**(11-12): p. 479-90.
118. Park, J.S., et al., *Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility group box 1 protein*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **284**(4): p. C870-9.
119. Kim, J.Y., et al., *HMGB1 contributes to the development of acute lung injury after hemorrhage*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **288**(5): p. L958-65.
120. Hillebrandt, S., et al., *Genome-wide analysis of hepatic fibrosis in inbred mice identifies the susceptibility locus Hfib1 on chromosome 15*. Gastroenterology, 2002. **123**(6): p. 2041-51.
121. Muse, M., et al., *Insertion of the CXC chemokine ligand 9 (CXCL9) into the mouse hepatitis virus genome results in protection from viral-induced encephalitis and hepatitis*. Virology, 2008. **382**(2): p. 132-44.



122. Shi, Z., A.E. Wakil, and D.C. Rockey, *Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 10663-8.
123. Pockros, P.J., et al., *Final results of a double-blind, placebo-controlled trial of the antifibrotic efficacy of interferon-gamma1b in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis or cirrhosis*. Hepatology, 2007. **45**(3): p. 569-78.
124. Petrai, I., et al., *Activation of p38(MAPK) mediates the angiostatic effect of the chemokine receptor CXCR3-B*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(9): p. 1764-74.
125. Calvaruso, V., et al., *Coagulation and fibrosis in chronic liver disease*. Gut, 2008. **57**(12): p. 1722-7.
126. Panasiuk, A., et al., *Blood platelet and monocyte activations and relation to stages of liver cirrhosis*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(18): p. 2754-8.
127. Iredale, J.P., *Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ*. J Clin Invest, 2007. **117**(3): p. 539-48.
128. Seki, E., et al., *CCR1 and CCR5 promote hepatic fibrosis in mice*. J Clin Invest, 2009. **119**(7): p. 1858-70.
129. Bonacchi, A., et al., *The chemokine CCL21 modulates lymphocyte recruitment and fibrosis in chronic hepatitis C*. Gastroenterology, 2003. **125**(4): p. 1060-76.

130. Holt, A.P., et al., *Liver myofibroblasts regulate infiltration and positioning of lymphocytes in human liver*. *Gastroenterology*, 2009. **136**(2): p. 705-14.

## Abkürzungsverzeichnis

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| ALT                           | Alanin Transaminase  |
| BCA1                          | CXCL13, <i>B cell-attracting chemokine 1</i>   |
| BLR1                          | CXCR5, <i>Burkitt lymphoma receptor</i>  |
| BRAK                          | CXCL14, <i>breast and kidney expressed chemokine</i>   |
| BSA                           | <i>Bovine Serum Albumine</i>   |
| CCl <sub>4</sub>              | Tetrachlorkohlenstoff  |
| CD                            | <i>Cluster of Differentiation</i>  |
| CO <sub>2</sub>               | Kohlenstoffdioxid  |
| DNS                           | Desoxyribonukleinsäure   |
| DTT                           | Dithioreitol   |
| ELISA                         | <i>Enzym-Linked Immunosorbent Assay</i>  |
| ENA78                         | CXCL5, <i>epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78</i>                                  |
| Eotaxin                       | CCL11  |
| FACS                          | Fluorescence Activated Cell Sorting  |
| FKS                           | Fetales Kälberserum  |
| Fractalkine                   | CX3CL1   |
| GCP2                          | CXCL6, <i>granulocyte chemoattractant protein 2</i>  |
| GRO $\alpha$                  | CXCL1  |
| GRO $\beta$                   | CXCL2  |
| GRO $\gamma$                  | CXCL3  |
| HCC                           | <i>Hepatocellular Carcinoma</i>  |
| HCC1                          | CCL14, <i>human CC chemokine 1</i>   |
| HCC2                          | CCL15, <i>human CC chemokine 2</i>   |
| HCl                           | Salzsäure  |
| HCV                           | Hepatitis C Virus  |
| HMGB 1                        | <i>High Mobility Group Box 1</i>   |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Wasserstoffperoxid   |
| ICAM-1                        | <i>Intracellular Adhesion Molecule-1</i>   |
| IFN- $\gamma$                 | Interferon- $\gamma$   |
| IL1                           | Interleukin 1  |
| IL6                           | Interleukin 6  |
| IL8                           | CXCL8, Interleukin 8   |
| IL8RA                         | CXCR1, Interleukin 8 Rezeptor alpha  |
| IL8RB                         | CXCR2, Interleukin 8 Rezeptor beta   |
| i.p.                          | intraperitoneal  |
| IP10                          | CXCL10, <i>interferon-gamma-induced protein 10</i>   |
| I/R                           | Ischämie/Reperfusion   |
| I-TAC                         | CXCL11, <i>interferon <math>\gamma</math>-inducible T cell <math>\alpha</math>-chemoattractant</i> |
| kDA                           | kiloDalton   |
| KIR                           | <i>Killer cell Immunoglobulin-like Receptor</i>  |
| LEC                           | CCL16, <i>liver-expressed chemokine 2</i>  |
| Lungkine                      | CXCL15   |
| Lymphotactin                  | XCL1   |
| MAPK                          | <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>  |
| MCP1                          | CCL2, <i>monocyte chemoattracting protein 1</i>  |

---

|               |   |
|---------------|---|
| MCP2          | CCL8, <i>monocyte chemoattracting protein 2</i>                             |
| MCP3          | CCL7, <i>monocyte chemoattracting protein 3</i>                             |
| MCP5          | CCL12, <i>monocyte chemoattracting protein 5</i>                            |
| MDC           | CCL22, <i>macrophage derived chemokine</i>                                  |
| MHC           | <i>Major Histocompatibility Complex</i>                                     |
| MHV           | muriner Hepatitis Virus   |
| MIG           | CXCL9, <i>monokine induced by gamma interferon</i>                          |
| MIP1 $\alpha$ | CCL3, <i>macrophage inflammatory protein 1</i>                              |
| MIP1 $\beta$  | CCL4, <i>macrophage inflammatory protein 2</i>                              |
| MIP3 $\alpha$ | CCL20, <i>macrophage inflammatory protein 3</i>                             |
| MOPS          | 3-N-(Morpholino)propansulfonsäure   |
| NAP2          | CXCL7, <i>neutrophil-activating protein 2</i>                               |
| NASH          | Nicht Alkoholische SteatoHepatitis  |
| NK-Zellen     | natürliche Killer-Zellen  |
| NKT-Zellen    | natürliche Killer T-Zellen  |
| PBS           | Phospho Buffered Saline   |
| PBS/Azid      | Phospho Buffered Saline mit Natriumazid                                     |
| PDGF          | <i>Platelet Derived Growth Factor</i>                                       |
| PFA           | Paraformaldehyd   |
| PF4           | CXCL4, <i>platelet factor 4</i>   |
| PMA           | Phorbol 12-myristat 13- acetat  |
| poly I:C      | <i>polyinosinic:polycytidylic</i>   |
| RANTES        | CCL5, <i>regulated upon activation normal T cell expressed and secreted</i> |
| RCC           | <i>Renal Cell Carcinoma</i>   |
| RIPA          | <i>Radioimmune Precipitation Assay</i>                                      |
| RNS           | Ribonukleinsäure  |
| rpm           | rounds per minute   |
| RT-PCR        | <i>RealTime Polymerase Chain Reaction</i>                                   |
| SDF1          | CXCL12, <i>stromal-derived factor 1</i>                                     |
| SDS           | Sodium Dodecyl Sulfate  |
| SexCkine      | CXCL16  |
| SLC           | CCL21, <i>secondary lymphoid chemokine</i>                                  |
| TAA           | Thioacetamid  |
| TARC          | CCL17, <i>thymus and activation-regulated chemokine</i>                     |
| TBS           | <i>Tris Buffered Saline</i>   |
| TBS-T         | <i>Tris Buffered Saline</i> mit Tween20                                     |
| TCR           | <i>T Cell Receptor</i>  |
| TECK          | CCL25, <i>thymus expressed chemokine</i>                                    |
| TGF- $\beta$  | Transforming Growth Factor- $\beta$   |
| Timp-1        | Tissue inhibitor of metalloproteinases 1                                    |
| TNF- $\alpha$ | <i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i>                            |
| VEGF          | <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>                                   |

## **Danksagung**

Als erstes möchte ich meinen Eltern für ihre Unterstützung während meines gesamten Lebens danken. Ohne sie wäre ich heute nicht an diesem Punkt in meinem Leben angekommen.

Ich möchte mich außerdem bei Prof. Dr. Trautwein bedanken. Er gab mir die Möglichkeit unter sehr guten Forschungsbedingungen in seiner Abteilung Medizinische Klinik III zu arbeiten.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Hermann Wasmuth für seine hervorragende wissenschaftliche und persönliche Unterstützung. Vielen Dank für die fruchtbaren Gespräche, die konstruktive Kritik und die Geduld, die das Gelingen dieser Arbeit ermöglichten.

Ein besonderer Dank geht an Fr. Petra Fischer. Ohne ihr Wissen, ohne ihre Ideen und ohne ihre tatkräftige Unterstützung wäre ich niemals soweit gekommen.

Auch bei den Mitarbeitern der AG Wasmuth, die mich nicht nur tatkräftig unterstützt haben, sondern mich stets aufbauten und für die erforderliche Abwechslung sorgten, möchte ich mich bedanken.

Ein weiterer Dank für Ideen, Anregungen und Hilfe geht an alle anderen Mitarbeiter der Medizinischen Klinik III.

Den größten Dank verdient meine Frau Anne. Sie brachte sehr viel Geduld während dieser Zeit auf und baute mich, falls nötig wieder auf. Sie hielt immer zu mir, ob in guten oder in schlechten Zeiten. Vielen Dank.