Rolle von IL-22 und IL-22BP in der Leberregeneration und -karzinogenese

Dissertation Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

angefertigt

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

vorgelegt von

Dörte Kleinschmidt

aus Haldensleben

Hamburg, April 2017

Gutachter: 1. **Prof. Dr. med. Samuel Huber**,

Molekulare Immunologie und Gastroenterologie, I. Medizinische Klinik und Poliklinik Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

2. **Prof. Dr. rer. nat. Thorsten Burmester**,

Abteilung für Stoffwechselphysiologie, Fachbereich Biologie, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, Universität Hamburg

Tag der Disputation: 30.06.2017

Inhaltsverzeichnis

	Авк	ÜRZUN	GSVERZEICHNIS	VII
1	E	INLE	ITUNG	. 1
	1.1	PHYS	SIOLOGIE UND AUFBAU DER LEBER	1
	1.2	LEBE	RREGENERATION	2
	1.3	HEPA	ATOZELLULÄRES KARZINOM (HCC)	4
	1.4	DIE I	LEBER ALS IMMUNOLOGISCHES ORGAN	6
	1.5	INTE	RLEUKIN-22 (IL-22)	9
	1.6	IL-22	2 BINDE-PROTEIN	13
	1.7	TIER	MODELLE EINES AKUTEN LEBERSCHADENS	14
	1.	7.1	Ischämie-und Reperfusionsschaden in der Leber	14
	1.	7.2	Acetaminophen-induzierter Leberschaden	15
	1.	7.3	Partielle Hepatektomie	16
	1.8	MDR	2 KNOCK-OUT MÄUSE (<i>Mdr2^{-/-}</i>) als Tiermodell eines chronisch	IEN
	110	LEBE	RSCHADENS.	16
	1.9	ZIEL	STELLUNG DER DOKTOBARBEIT	18
	1.			
2	Μ	IATE	RIAL UND METHODEN	19
	2.1	MAT	ERIALIEN	19
	2.	1.1	Instrumente	19
	2.	1.2	Glas- und Kunststoffverbrauchsmaterialien	21
	2.	1.3	Chemikalien	22
	2.	1.4	Substanzen	22
	2.	1.5	Antikörper Western Blot	23
	2.	1.6	Antikörper Durchflusszytometrie	24
	2.	1.7	Oligonukleotide	25
		2.1.7.	1 Oligonukleotide für die semiquantitative PCR	25
		2.1.7.2	2 TaqMan Gene Expression Assays	25
	2.	1.8	Software	26
	2.2	MET	HODEN	26
	2.	2.1	Versuchstiere und Versuchstierhaltung	26
		2.2.1.	1 Reportermäuse	27
		2.2.1.2	2 Ischämie- und Reperfusionsschaden in der Leber	28
		2.2.1.	3 Acetaminophen-induzierter Leberschaden	29
		2.2.1.4	4 Partielle Hepatektomie	. 29
	2	2.2.1.	DNA Arbeitstechniken	29
	۷.	2.2	DINA-AIDentsteenniken	3U 20
		<i>L.L.L</i> .	1 Isonerung genomischer DivA aus Gewede	30

2.2.2	2.2	Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	30
2.2.2	2.3	Auftrennung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese	31
2.2.3	R	NA-Arbeitstechniken	32
2.2.3	3.1	RNA-Extraktion aus dem Gewebe	32
2.2.3	3.2	RNA-Aufreinigung	32
2.2.3	3.3	Bestimmung der RNA-Konzentration	33
2.2.3	3.4	RNA-Sequenzierung	33
2.2.3	3.5	Reverse Transkription	33
2.2.3	3.6	Quantitative Real-time PCR	34
2.2.4	Pı	rotein-Arbeitstechniken	35
2.2.4	4.1	Proteinextraktion aus dem Zelllysat	35
2.2.4	4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	35
2.2.4	4.3	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
2.2.4	4.4	Western Blot und Immunodetektion	37
2.2.5	Η	istologie	38
2.2.5	5.1	Präparation der Organe	38
2.2.5	5.2	Hämatoxylin-Eosin Färbung von Paraffinschnitten	38
2.2.5	5.3	Ki-67 Färbung	39
2.2.5	5.4	TUNEL-Methode	40
2.2.6	D	urchflusszytometrie	41
2.2.6	6.1	Isolation von Lymphozyten und Antigenpräsentierenden Zellen aus der Leber	41
2.2.6	6.2	Zellzahlbestimmung mit Trypanblaufärbung	41
2.2.6	6.3	Restimulation von Zellen	42
2.2.6	6.4	Färbung extrazellulärer Oberflächenmarker	42
2.2.6	6.5	Lebend/tot Färbung von Zellen für die Durchflusszytometrie	42
2.2.6	6.6	Intrazelluläre Zytokinfärbung	43
2.2.6	6.7	Durchflusszytometrie	43
ERGI	EBN	VISSE	44
3.1 DIE	Ro	LLE VON IL-22 UND IL-22BP IM AKUTEN LEBERSCHADEN	44
3.1.1	Is	chämie- und Reperfusionsmodell (IR)	44
3.1.1	1.1	Regulation von Il22, Il22bp und Il22r1 während eines IR-induzierten Schadens	44
3.1.1	1.2	Einfluss von IL-22 und IL-22BP auf den Ischämie- und Reperfusionsschaden in der Leber	45
3.1.1	1.3	Nachweis eines IL-22 abhängigen Effekts der Leberschädigung in den Il22bp ^{-/-} Tieren	48
3.1.1	1.4	Untersuchung der Proliferationsrate und des Ausmaßes an apoptotischen Hepatozyten nach	IR-
		Induktion	.49
3.1.2	Α	cetaminophen(APAP)-induzierter Leberschaden	52
3.1.2	2.1	Regulation von Il22, Il22bp und Il22r1 während einer APAP-vermittelten Leberschädigung	52
3.1.2	2.2	Einfluss von IL-22 und IL-22BP auf die hepatoxische Wirkung von Acetaminophen	53
3.1.2	2.3	Nachweis der Proliferations- und Apoptoserate nach APAP-induzierten Leberschaden	56
3.1.3	Pa	artielle Hepatektomie (PHx)	58
3.1.3	3.1	Regulation von <i>Il22</i> , <i>Il22bp</i> und <i>Il22r1</i> nach einer partiellen Hepatektomie	58
			IV

3

3.1.3.2	Ermittlung des Lebervolumens nach partieller Hepatektomie 59
3.1.3.3	Histologische Überprüfung der Proliferationsrate und Morphologie nach partieller Hepatektomie
3.1.4	Charakterisierung der leukozytären Zellinfiltration während eines IR-vermittelten
]	Leberschadens
3.1.5	Untersuchung der zellulären Quelle von <i>Il22</i> und <i>Il22bp</i> nach einem IR-vermittelten
	Schaden
3.1.6	Untersuchung des Mechanismus der verstärkten Leberschädigung in <i>Il22bp^{-/-}</i> Tieren nach
(einem IR-induzierten Schaden
3.1.6.1	RNA-Sequenzierung
3.1.6.2	Überprüfung eines CXCL10 abhängigen Mechanismus der verstärkten Leberschädigung in den
	<i>Il22bp^{-/-}</i> Tieren
3.1.7	Untersuchung der Expression von Cxcl10 und Cyp2e1 im APAP-induzierten Leberschaden
3.1.8	Überprüfung der Leukozytenzusammensetzung nach einem APAP-induzierten
]	Leberschaden in Wildtypen, <i>Il22^{-/-}</i> und <i>Il22bp^{-/-}</i> Tieren
3.1.9	Aktivierung von STAT3 im APAP-vermittelten Schaden im Lebergewebe von Wildtypen,
i	<i>Il22^{-/-}</i> und <i>Il22bp^{-/-}</i> Tieren
3.2 EINFL	USS VON IL-22 UND IL-22BP IM <i>MDR2^{-/-}</i> MODELL
3.2.1	Regulation der Genexpression von <i>Il22</i> , <i>Il22bp</i> und <i>Il22r1</i> im <i>Mdr2^{-/-}</i> Modell
3.2.2	Untersuchung der Tumorentwicklung in Mdr2 ^{-/-} , Il22 ^{-/-} /Mdr2 ^{-/-} und Il22bp ^{-/-} /Mdr2 ^{-/-}
r	Tieren
3.2.3	Untersuchung der Funktion von IL-22 und IL-22BP in der Leberschädigung der Mdr2-/-
r	Tiere im zeitlichen Verlauf
3.2.4	Einfluss von IL-22 und IL-22BP auf die Proliferation während der Tumorentwicklung in
(den <i>Mdr2^{-/-}</i> Tieren
3.2.5	Leukozytenzusammensetzung während der Tumorentwicklung in den Mdr2-/-, Il22-/-/
Ì	$Mdr2^{-/-}$ und $Il22bp^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ Tieren
DISKUS	SSION91
4.1 DER I	EINFLUSS VON IL-22 UND IL-22BP AUF DIE REGENERATION UND INFLAMMATION
WÄHR	end einer akuten Leberschädigung 91
4.1.1	Expressionsmuster von <i>Il22</i> , <i>Il22bp</i> und <i>Il22r1</i> während einer akuten Leberschädigung. 93
4.1.2	Funktion von IL-22 und IL-22BP während der Regeneration nach einer IR-induzierten
]	Leberschädigung
4.1.3	Pro-inflammatorischer Einfluss von IL-22 durch fehlende Kontrolle von IL-22BP nach
(einem IR-vermittelten Leberschaden
4.1.4	Zelluläre Quelle von <i>Il22</i> und <i>Il22bp</i> nach einem IR-Schaden
4.1.5	IL-22 abhängige <i>Cxcl10</i> Überexpression verstärkt die IR-induzierte Leberschädigung 96
	and a construction of the second second and the second sec

4

	4.1.6	Protektiver Einfluss von IL-22 auf die Regeneration nach einem APAP-induzierten
		Leberschaden
	4.1.7	Pathogene Funktion von IL-22 während der APAP-induzierten Hepatoxizität
	4.1.8	Einfluss von IL-22 und IL-22BP auf die Leberregeneration nach einer partiellen
		Hepatektomie
4.	2 D IE 1	FUNKTION VON IL-22 UND IL-22BP WÄHREND DER HEPATOKARZINOGENESE IM MDR2 ^{-/-}
	Мог	DELL
	4.2.1	Expressionsanalyse von <i>Il22</i> , <i>Il22r1</i> und <i>Il22bp</i> im Lebergewebe der <i>Mdr2^{-/-}</i> Tiere 105
	4.2.2	Deletion von IL-22 reduziert tendenziell die Tumorentwicklung in den $Mdr2^{-/-}$ Tieren. 106
	4.2.3	Charakterisierung von verschiedenen Immunzellen während der Hepatokarzinogenese in
		den <i>Mdr2</i> ^{-/-} Tieren 108
5	ZUSA	MMENFASSUNG110
5.	1 SUM	MARY
6	AUSB	LICK
7	LITEF	ATURVERZEICHNIS114
8	PUBL	IKATIONEN
9	DANK	SAGUNG
10	EIDES	STATTLICHE VERSICHERUNG130

Abkürzungsverzeichnis

-/-	Deletierte Allele
Α	Ampere
ab	Antibody
Abb.	Abbildung
ad	additiv
AF	Alexa Fluor
AKT	Serin/Threoninkinasen (bekannt als Proteinkinase B)
ALT	Alanin-Aminotransferase
Aqua dest.	Aqua destillate
APAP	N-Acetyl-p-Aminophenol (= Acetaminophen)
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninic acid
Bcl	B-cell lymphoma
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
BFP	Blau-fluoreszierendes Protein
bp	Base pair
bp	Binding protein
BSA	Bovines Serum Albumin
BV	Brilliant Violet
Ca	Calcium
Ccl	Chemokine (C-C motif) ligand
Ccr	C-C chemokine receptor
CD	Cluster of differentiation (Differenzierungsmarker)
cDNA	mRNA komplementärer Strang (= complementary DNA)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
ConA	Concanavalin A
ct	Cycle threshold
Cu	Kupfer
Cxcl	Chemokine (C-X-C-Motif) ligand

DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	Double distilled water
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (= desoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
DSS	Dextran sodium sulfate
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
et al.	et alii
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	fetales Kälberserum (= fetal bovine serum)
Fc	Fragment crystallizable
FGF	Fibroblast growth factor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Foxp3	Forkhead box P3
FSC	Forward scatter (= Vorwärtsstreulicht)
fwd	forward
FXR	Farnesoid X receptor
g	Gramm
g	Einheit für Zentrifugalbeschleunigung
G ₁ -Phasen	Gap-Phasen
GFP	Grün-Fluoreszierendes Protein
gp	Glykoprotein
h	Stunde
H_2O	Dihydrogenmonoxid
H&E	Hämatoxylin & Eosin
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatocellular carcinoma
HCl	Salzsäure

HCV	Hepatitis C Virus
HGF	Hepatocyte growth factor
Hprt	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase
HRP	Horseradish peroxidase
i.p.	intraperitoneal
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ILC	Innate lymphoid cell
IR	Ischämie/Reperfusion
IRES	Internal ribosome entry site
JAK	Janus Kinase
K	Kalium
kB	Kilobase
kDA	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KO	Knock-out
L	Liter
LoxP	Locus of X-over P1
LTi	Lymphoid tissue inducer
Ly6c	Lymphocyte antigen 6 complex, locus C
Ly6g	Lymphocyte antigen 6 complex, locus G
Μ	Molar
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Mdr	Multidrug-resistance
mg	Milligramm
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
miRNA	Micro ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
n	Anzahl
n.d.	nicht detektierbar

n.s.	statistisch nicht signifikant
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NAPQI	N-Acetyl-p-benzochinonimin
Neo	Neomycin
NETs	Neutrophil extracellular traps
NF-кB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NKp cell	Natural killer cell precursor
NLRP3	Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors
	pyrin domain containing 3
NP-40	Nonoxinol 40
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PD-1	Programmed cell death protein 1
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PFA	Paraformaldehyd
рН	potentia hydrogenii
PHx	Partielle Hepatektomie
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
qRT-PCR	Quantitative real time PCR
R	Rezeptor
rcf	Relative centrifugal force
Reg3y	Regenerating islet-derived protein 3 gamma
RFP	Rot-fluoreszierendes Protein
rev	reverse
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
RORyt	RAR-related orphan receptor gamma
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur

RT	Reverse Transkription		
S100A7	S100 calcium binding protein A7		
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)		
sec	Sekunde		
SEM	Standard error of the mean		
SH	Src homology		
SOCS	Suppressor of cytokine signaling		
SSC	Side scatter (= Seitwärtsstreulicht)		
STAT	Signal transducer and activator of transcription		
Taq	Thermus aquaticus		
TBE	Tris-Borat-EDTA		
TBS	Tris-buffered saline		
TBST	Tris-buffered saline plus tween		
TCR	T cell receptor		
TEMED	Tetramethylethylendiamin		
TGF-β	Transforming growth factor β		
T _H -Zelle	T-Helfer-Zelle		
tk	Thymidinkinase		
TNF	Tumornekrosefaktor		
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan		
TUNEL	terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated 2'-deoxyuridine		
	5'-triphosphate nick end labeling		
ТҮК	Tyrosinkinase		
U	Units (Enzymaktivität; 1 U = 1 mol x min ⁻¹)		
UV	Ultraviolettes Licht		
V	Volt		
VE-H ₂ O	voll entsalztes Wasser		
VEGF	Vascular endothelial growth factor		
Vol.	Volumen		
WT	Wildtyp		

1 Einleitung

1.1 Physiologie und Aufbau der Leber

Als zentrales Stoffwechselorgan ist die Leber an der Verdauung und Speicherung von Nährstoffen wie Glucose, Fetten und Vitaminen beteiligt und erfüllt somit bedeutende Funktionen im Kohlenhydrat-, Protein- und Fettstoffwechsel. In diesem Zusammenhang wird überschüssige Glucose in den Speicherstoff Glykogen umgewandelt und Fettsäuren sowie auch Gallensäuren synthetisiert. Darüber hinaus produziert die Leber Plasmaproteine wie Albumin und wichtige Gerinnungsfaktoren. Sie reguliert den Bilirubinmetabolismus, den Abbau von Ammoniak und trägt zur Entgiftung von Toxinen bei¹.

Die kleinste anatomische Einheit der Leber stellen die Leberläppchen dar, welche sich aus den Leberparenchymzellen, den Hepatozyten und den nicht-parenchymatösen Zellen, den Endothelzellen, Kupffer-Zellen, Lymphozyten, dendritische Zellen und hepatischen Sternzellen zusammensetzen². Die Hepatozyten sind für die metabolischen und sekretorischen Prozesse der Leber verantwortlich und bilden mit bis 80% den größten Anteil des Lebervolumens. Die Leberparenchymzellen stehen untereinander durch Zell-Zellkontakte (gap junctions) in Verbindung und sind wie alle Epithelzellen polarisiert. Gallensäuren, die nicht nur von Hepatozyten, sondern auch von Cholangiozyten produziert werden, gelangen durch Vertiefungen von benachbarten Hepatozyten in die abführenden Gallengänge³. Die Gallenfüssigkeit wird anschließend in der Gallenblase als Zwischenspeicher gesammelt oder gelangt direkt in den Zwölffingerdarm. Die Leber wird zum einen mit arteriellem Blut über die Arteria hepatica versorgt, zum anderen gelangt venöses nährstoffreiches Blut aus den unpaaren Bauchorganen Magen, Darm, Milz und Bauchspeicheldrüse über die Vena portae (Pfortader) in das Stoffwechselorgan. Beide Blutgefäße verzweigen sich und münden in die erweiterten Kapillaren der sogenannten Lebersinusoide. Das Blut wird mit Hilfe der Sinusoide zum Zentrum des Leberläppchens transportiert und an dieser Stelle durch die Vena centralis abgeführt¹. Die Lebersinusoide werden durch Endothelzellen ausgekleidet, welche keine Basalmembran aufweisen. Das fenestrierte Endothel ermöglicht das Passieren von größeren Molekülen in den Raum zwischen den Endothelzellen und den Hepatozyten (Dissé-Raum)⁴. Die Mikrovilli der Hepatozyten ragen in diesen Interzellularraum, sodass unter anderem Nährstoffe aus dem Blut aufgenommen werden und Syntheseprodukten der Hepatozyten abgegeben werden können. Des Weiteren befinden sich dort auch die hepatischen Sternzellen, die zur Vitamin A und Fettspeicherung befähigt sind. Darüber hinaus kann sich dieser Zelltyp zu Myofibroblasten differenzieren, Kollagen synthetisieren und besitzt zudem eine wichtige Funktion im Aufbau der extrazellulären Matrix⁵.

1.2 Leberregeneration

Die Leber weist ein enormes Regenerationspotential auf, welches durch eine kompensatorische Hyperplasie des verbleibenden Lebergewebes gekennzeichnet ist. Bei einer Gewebeschädigung, etwa infolge einer Leberteilresektion oder Intoxikation, findet eine schnelle und effektive Replikation von ausdifferenzierten Hepatozyten statt⁶. Die Regeneration nach einer übermäßigen Zerstörung des Leberparenchyms wird durch die Proliferation von hepatischen Progenitorzellen mit anschließender Ausdifferenzierung zu Hepatozyten und Cholangiozyten unterstützt⁷. Eine Leberteilresektion verursacht einen erhöhten Pfortaderdruck, der eine Hyperperfusion im verbleibenden Lebergewebe auslöst. Die daraus resultierenden Druck- und Scherkräfte, die auf das Endothel einwirken, und der vermehrte Zustrom von Signalmolekülen aus der portalen Zirkulation werden gleichermaßen als potentieller Stimulus für die Einleitung des Regenerationsprozesses diskutiert⁸. Ein Verlust von funktionellem Lebergewebe führt durch die Freisetzung von verschiedenen Mediatoren dazu, dass die Hepatozyten von der G_0 -Phase in die G_1 -Phase übertreten und anschließend den Zellzyklus durchlaufen⁹. Kupffer-Zellen werden unter anderem durch Lipopolysaccharide stimuliert, die aus dem venösem Blut des Gastrointestinaltraktes stammen und über die Pfortader zur Leber transportiert werden¹⁰. Die Aktivierung der Kupffer-Zellen führt mit Hilfe des NF-κB-Signalweges zur Sekretion von TNF-a und löst infolgedessen durch einen autokrinen Mechanismus die Produktion von IL-6 in den leberspezifischen Makrophagen aus^{11,12}. IL-6 bewirkt durch die Bindung an den membran-gebundenen IL-6 Rezeptor, der von Hepatozyten exprimiert wird, die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 und die Aktivierung des MAPK-Signalweges und initiiert somit den Eintritt in den Zellzyklus^{13,14}. STAT3 reguliert die Expression von mitogenen Faktoren, unter anderem

Cyclin D und anti-apoptotischen Genen, wie Bcl2 und Bcl-XL¹⁵. Darüber hinaus zirkulieren Wachstumsfaktoren wie EGF systemisch im Blut, die wiederum für die Progression des Zellzyklus in den Hepatozyten entscheidend sind¹⁶. Zugleich wird zusätzlich HGF durch den Abbau der extrazellulären Matrix mit Hilfe von Matrix-Metalloproteinasen und Plasmin freigesetzt¹⁷. Der hepatische und intestinale Gallensäure-Rezeptor FXR ist ebenso bedeutend in der Leberregeneration, da eine Aktivierung des Rezeptors die Gallensäure-Homöostase reguliert und somit vor Hepatoxizität durch erhöhte Mengen von Gallenflüssigkeit schützt^{18,19}. Zugleich werden weitere Transkriptionsfaktoren, die am Fortlauf des Zellzyklus beteiligt sind, durch den Rezeptor aktiviert²⁰. Des Weiteren sind Hepatozyten für die Produktion von Mitogenen verantwortlich, die auf nicht-parenchymatöse Zellen wie sinusoidale Endothelzellen, Cholangiozyten und Kupffer-Zellen einwirken und die Proliferation anregen⁶. Der regenerative Prozess wird nach Erreichen des ursprünglichen Lebervolumens durch inhibitorische Faktoren wie Activin und TGF-β, welches hauptsächlich von hepatischen Sternzellen sezerniert wird, unterdrückt²¹. Auf post-transkriptioneller Ebene sind möglicherweise auch regulatorische miRNAs beteiligt, die in der späten Phase der Leberregeneration hochreguliert werden²². Zudem ist FGF-19 in der Regulation des Gallensäuremetabolismus von Bedeutung und spielt in dem Zusammenhang auch an der Terminierung des Wachstumsprozesses eine wichtige Rolle²³. IL-6 ist zudem für die Aktivierung von SOCS3 verantwortlich, sodass eine Inhibition des JAK-STAT-Signalweges erfolgt und gleichzeitig das IL-6 Signal kontrolliert und im Laufe der Regeneration vermindert wird^{13,24}.



Abbildung 1.1: IL-6-STAT3-Signalweg. TNF- α bindet an seinem Rezeptor an der Oberfläche der Kupffer-Zelle, wodurch die IL-6 Genexpression mittels NF- κ B Signalweg hochreguliert und IL-6 sezerniert wird. IL-6 bindet an den membran-ständigen IL-6R auf den Hepatozyten. Die Interaktion mit dem Rezeptor und der beiden gp130 Untereinheiten aktiviert die Januskinase und bewirkt einerseits die Aktivierung des MAPK-Signalweges und andererseits wird STAT3 phosphoryliert, sodass zwei STAT3-Moleküle dimerisieren und in den Nukleus translozieren. STAT3 aktiviert im Zellkern die Transkription von anti-apoptotischen Genen, sowie Zielgenen die an der Regeneration und Akute-Phase-Antwort beteiligt sind. IL-6 bewirkt ebenso die Expression von SOCS3-Molekülen, die wiederum in der Lage sind die Januskinase zu blockieren und somit als negativer Regulator dienen²⁴.

1.3 Hepatozelluläres Karzinom (HCC)

Das hepatozelluläre Karzinom stellt weltweit mit jährlich über 500.000 Neuerkrankungen den fünfhäufigsten malignen Tumor dar. Die 5-Jahres-Überlebensrate von HCC-Patienten beträgt überwiegend weniger als 12%. Die Inzidenz des HCC zeigt deutlich regionale Unterschiede. Vor allem in Ländern Südostasiens und der Subsahara treten vergleichsweise zu Europa und Nordamerika vermehrt Neuerkrankungen auf ²⁵. Die verstärkte Exposition zu Aflatoxin B1 in Nahrungsmitteln und häufige Hepatitis B Infektionen mit einem chronischen Verlauf führen zu hohen Inzidenzraten in diesen Gebieten²⁶. Weitere Risikofaktoren sind darüber hinaus chronische Hepatitis C Infektionen, Alkoholmissbrauch und in den letzten Jahren die verstärkte Zunahme einer nichtalkoholischen Fettlebererkrankung sowie die daraus folgende Steatohepatitis in vor allem industrialisierten Ländern^{27,28}. Stoffwechselbedingte Krankheiten wie die heriditäre Hämochromatose und ein α -1-Antitrypsin-Mangel können ebenso die Kanzerogenese in der Leber unterstützen^{29,30}. Die Ursache der Entstehung eines HCC ist vorwiegend ein lang andauernder Leberschaden, der in vielen Fällen mit einer Leberzirrhose assoziiert ist. Chronische Entzündungszustände mit fortwährenden Regenerationsprozessen sind mit einer Aktivierung der hepatischen Sternzellen verbunden, wodurch mittels Kollagensynthese eine Fibrosierung des Leberparenchyms stattfindet und eine Dysplasie mit anschließender maligner Transformation begünstigt wird. Genmutationen, epigentische Faktoren und Veränderungen von Signalwegen fördern die Entwicklung und Progression des Leberzellkarzinoms³¹. Molekulare Analysen von Patienten zeigen sowohl eine gestörte Regulation von Proto-Onkogenen, zum Beispiel β-Catenin und PIK3CA, als auch Mutationen von Tumorsuppressoren wie etwa p53³²⁻³⁴. Des Weiteren sind der Wnt- und auch der Hedgehog-Signalweg, welche in der Zelldifferenzierung eine wichtige Rolle spielen, in der Hepatokarzinogenese häufig verändert^{35,36}. Die Diagnosestellung erfolgt hauptsächlich im fortgeschrittenen Stadium, da das hepatozelluläre Karzinom erst sehr spät zu Symptomen führt. Therapiemöglichkeiten sind vor allem chirurgische Maßnahmen wie Tumorresektion und Lebertransplantation³¹. Das HCC weist eine äußert hohe Resistenz gegenüber Zytostatika auf. Sorafenib, ein Multi-Kinase-Inhibitor, der anti-proliferative und antiangiogenetische Effekte besitzt, zeigt eine limitierte Wirksamkeit^{37,38}. Weitere Behandlungsmethoden sind minimal-invasive Verfahren, die im Wesentlichen das Tumorgewebe und die Gefäßversorgung lokal zerstören. Dazu gehören die Laserinduzierte Thermotherapie, Radiofrequenzablation, transarterielle Chemoembolisation (TACE) und die Mikrowellentherapie³⁹.



Abbildung 1.2: Histopathologische Entwicklung und molekulare Merkmale des HCC. Nach einem Leberschaden durch verschiedene Faktoren, wie z.B. HBV, HCV, Alkohol oder Aflatoxin B1 wird Nekrose mit anschließender Hepatozytenproliferation induziert. Fortdauernde Zyklen von destruktiven und regenerativen Prozessen begünstigen eine chronische Leberentzündung mit anschließender Leberzirrhose. Eine Zirrhose ist charakterisiert durch abnormale Knotenbildung, Kollagenansammlungen und Vernarbungen. Es entstehen hyperplastische Knoten gefolgt von dysplastischen Herden, die sich letztendlich zu einem hepatozellulären Karzinom entwickeln. Eine weitere Klassifizierung hängt von dem Differenzierungsgrad der Tumorzellen ab. Wenig differenzierte Tumore stellen die bösartigste Form des primären HCC dar. Telomerverkürzung ist eine Eigenschaft von chronischen Lebererkrankungen und Zirrhose. Die Hepatokarzinogenese zeichnet sich wiederum durch Reaktivierung der Telomerase aus. Der Verlust oder Mutation von p53 und genomische Instabilität sind weitere Einflussfaktoren in der Tumorentwicklung³¹.

1.4 Die Leber als immunologisches Organ

Die Leber weist verschiedene immunregulatorische Funktionen auf, indem sie an der Synthese von Akute-Phase-Proteinen beteiligt ist, Komplementfaktoren produziert und Aufgaben wie die Eliminierung von aktivierten T-Zellen erfüllt^{2,40}. Über die Pfortader wird die Leber mit nährstoffreichem Blut aus dem Darm versorgt und ist somit auch verschiedenen Toxinen, Viren und Bakterien ausgesetzt⁴¹.

Die andauernde Exposition zu endotoxischen Lipopolysacchariden aus der Pfortader scheint eine Toleranz gegen inflammatorische Stimuli und eine Vielzahl von Antigenen zu verursachen, die daher in der Leber als nicht immunrelevant bewertet werden⁴². Die Aufnahme und Präsentation von Antigenen durch tolerogene nicht-parenchymatische und parenchymatische Leberzellen induzieren die Immuntoleranz in der Leber^{43,44}.

Weiterhin verhindert die Expression von inhibitorischen Molekülen wie Arginase, Galectin-9, IL-10 und PD-1 die T-Zellaktivierung und T-Zellexpansion⁴⁵⁻⁴⁷. Somit wird maßgeblich eine Gewebeschädigung auf Grund verstärkter Immunantwort des adaptiven Immunsystems wie etwa durch zytotoxischen T-Lymphozyten unterbunden⁴⁸. Jedoch kann dieser Mechanismus dazu führen, dass eine ausreichende Immunantwort gegen Pathogene z.B. Hepatitis B und Hepatitis C Virusinfektionen unterdrückt wird^{43,49,50}.

Kupffer-Zellen, die leberresidenten Makrophagen, befinden sich im Lumen der Lebersinusoide und phagozytieren vor allem Antigene, pathogene Organismen und Überreste von sterbenden Zellen⁵¹. Phagozytierte Antigene werden auf der Oberfläche durch MHC II Moleküle präsentiert und von CD4⁺ T-Lymphozyten erkannt. Weitere Antigen präsentierende Zellen sind leberresidente dendritische Zellen, welche zu den nahegelegenen lymphatischen Organen wandern und dort T-Zellen aktivieren⁵². In erster Linie werden mit Hilfe von Pattern-Recognition-Rezeptoren wie beispielsweise Toll-like-Rezeptoren pathogene Krankheitserreger erkannt und die angeborene Immunantwort ausgelöst. Diese Rezeptoren werden von Hepatozyten, hepatischen Sternzellen, sinusoidalen Endothelzellen, Kupffer-Zellen und dendritischen Zellen exprimiert und stimulieren nach Aktivierung die pro-inflammatorische Zytokinproduktion wie TNF- α , IL-6 und Interferone. NK-Zellen werden infolge dessen verstärkt aktiviert und die Antigenpräsentation optimiert⁴³.

Neutrophile Granulozyten werden mittels Freisetzung von Zytokinen, z.B. TNF-α, oder auch bestimmten Chemokinen in die Sinusoide der Leber rekrutiert⁵³. Anschließend wird die Migration in das Leberparenchym durch spezielle Adhäsionsmoleküle wie β_2 Integrine ermöglicht⁵⁴. Neutrophile sind in der Lage Mikroorganismen einerseits durch Phagozytose und die Bildung reaktiver Sauerstoffmoleküle zu entfernen und andererseits mit Hilfe der Freisetzung von antibakteriellen Proteinen zu beseitigen^{55,56}. Des Weiteren synthetisieren neutrophile Granulozyten Neutrophile Extracellular Traps Chromatin und antimikrobiellen (NETs), Strukturen aus Enzymen, die Mikroorganismen immobilisieren und abtöten⁵⁷. Allerdings können Neutrophile während eines Leberschadens auch an der Zerstörung von Hepatozyten durch oxidativen Stress beteiligt sein und verstärken somit das Absterben des

Leberparenchyms⁵⁸.

Die Leber besitzt prozentual gegenüber anderen Organen den größten Anteil an NK-Zellen, welche vor allem für die Lyse von infizierten und malignen Zellen und die Zytokinproduktion von IFN-γ sowie TNF-α verantwortlich sind⁵⁹⁻⁶¹. Darüber hinaus können diese Lymphozyten auch aktivierte Sternzellen, die für die Fibrosierung der Leber eine entscheidende Rolle spielen, abtöten⁶². Die Erkennung von entarteten Zellen erfolgt unter anderem mit Hilfe von speziellen aktivierenden und inhibierenden KIR-Rezeptoren, die zur Gruppe der MHC Klasse I Rezeptoren gehören⁶³. Tumorzellen oder von Mikroorganismen befallene Zellen weisen im Gegensatz zu gesunden Zellen oftmals nur eine geringe Expression von MHC I Molekülen auf. Der fehlende inhibierende MHC I Komplex aktiviert die NK-Zelle und löst in der Zielzelle verschiedene Signalwege aus, die zur Apoptose führen^{60,64}.

Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen, NKT Zellen sowie NK-Zellen stellen anteilmäßig neben den CD4⁺ T-Helferzellen und B-Zellen die größten Lymphozytenpopulationen in der Leber dar^{65,66}. T-Zellen werden mit Hilfe ihres T-Zellrezeptors aktiviert. Dabei interagiert das Membranprotein CD8 mit den MHC-Komplexen der Klasse I, während CD4 mit den MHC-Komplexen der Klasse II von Antigen-präsentierenden Zellen in Interaktion tritt^{67,68}. Darüber hinaus sind auch co-stimulatorische Signale durch Membranproteine wie CD80 und CD86, die von Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert werden und mit dem CD28 Rezeptor der T-Zellen in Wechselwirkung treten, für die Aktivierung wichtig⁶⁹. Zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen sind an der Zytokinproduktion von TNF- α und IFN- γ beteiligt und zerstören infizierte, entartete sowie beschädigte Zellen⁷⁰. Dabei werden ähnlich wie bei den NK und NKT-Zellen Zytotoxine unter anderem Perforin und Granzym freigesetzt, wodurch die Apoptose eingeleitet wird. Zusätzlich kann über den Fas/Fas-Ligand Mechanismus ebenfalls die Apoptose in der Zielzelle induziert werden⁷¹⁻⁷³. CD4⁺ T-Lymphozyten werden in verschiedene Teilpopulationen untergliedert, unter anderem gehören dazu T_H1, T_H2, $T_{\rm H}17$ und $T_{\rm H}22$ Zellen⁷⁴. $T_{\rm H}1$ -Zellen zeichnen sich durch ihre Produktion von IFN- γ aus und beseitigen intrazelluläre Pathogene⁷⁵. $T_H 2$ Zellen sind an der Kontrolle von Infektionen mit Parasiten beteiligt und setzen Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-13 frei⁷⁶. T-Helferzellen lösen zugleich auch die humorale Immunantwort durch Differenzierung

der B-Lymphozyten und daraus folgender Antikörperproduktion aus⁷⁷. T_H17 Zellen sind in der Abwehr von extrazellulären Pathogenen durch die Rekrutierung von Neutrophilen involviert und produzieren sowohl IL-17A/F als auch IL-22, welches ebenso von T_H22 Zellen exprimiert wird⁷⁸⁻⁸¹. Eine weitere T-Zellpopulation stellen die regulatorischen T-Zellen (Treg) dar, die vor allem eine Immunantwort supprimieren können und in der Immuntoleranz der Leber eine entscheidende Rolle spielen⁸². Die zwei am besten untersuchten Subtypen von regulatorischen T-Zellen sind, die Foxp3+ Treg und die Foxp3 negativen Typ 1 regulatorischen T-Zellen (TR1)⁸³. Ein wichtiges Merkmal dieser T-Zellpopulation ist die Synthese von TGF
β und IL-10, welche eine anti-inflammatorische Wirkung besitzen⁸⁴. Neben den klassischen T-Lymphozyten, deren T-Zellrezeptor aus α - und β -Untereinheiten bestehen, weist die Leber eine weitere größere T-Zellpopulation die $\gamma\delta$ T-Zellen auf⁸⁵. Diese Lymphozyten exprimieren γ - und δ-Untereinheiten für den Aufbau des T-Zellrezeptors⁸⁶. $\gamma\delta$ T-Zellen erkennen zum einen Antigene mit Hilfe des MHC Komplexes, können aber auch zum anderen direkt ohne Interaktion mit dem T-Zellrezeptor an nicht-peptidische Moleküle binden⁸⁷. Ähnlich wie die klassischen T-Zellen können sie Apoptose in den Zielzellen auslösen, cytotoxische Granula freisetzen und Zytokine ausschütten⁸⁸⁻⁹⁰.

1.5 Interleukin-22 (IL-22)

IL-22 gehört wie auch IL-19, IL-20, IL-24 und IL-26 zu der IL-10 Zytokin-Familie. Das Zytokin wird von dem humanen IL22 Gen kodiert und befindet sich auf dem Chromosom 12⁹¹. In der Maus ist das Gen *Il22* auf dem Chromosom 10 lokalisiert⁹². IL-22 besitzt als Protein eine Länge von 179 Aminosäuren und nach Entfernen des Signalpeptides eine Länge von 146 Aminosäuren. Die biologisch aktive Form ist ein Monomer. Darüber hinaus kann IL-22 auch als Di- oder Tetramer vorliegen. Jedoch sind diese Formen weniger funktionell wirksam⁹³. Die zelluläre Quelle des Zytokins hängt vor allem von der Natur einer Erkrankung ab. IL-22 wird von verschiedenen Immunzellen produziert und wirkt auf Epithelzellen der Haut. des Gastrointestinaltraktes, der Leber, der Lunge, der Niere sowie des Pankreas⁹⁴. Überwiegend T-Zellen und innate lymphoid cells (ILCs) sind eine wichtige Quelle von IL-22 im Menschen. CD4⁺-Lymphozyten wie T_H1, T_H17 und T_H22-Zellen exprimieren neben den CD8⁺, NKT und γδ T-Zellen das Protein. Des Weiteren sind ebenso NK-

Zellen, lymphoid tissue inducer cells (LTi), Makrophagen und neutrophile Granulozyten in der Lage IL-22 zu produzieren^{81,95-102}. Die Expression von IL-22 ist stark von IL-23 abhängig, jedoch fördern auch IL-1ß und IL-6 die Produktion in verschiedenen Zelltypen^{80,81,94}. Zudem unterstützen Transkriptionsfaktoren wie AHR. STAT3, STAT4 und RORyt die Expression von IL-22¹⁰³⁻¹⁰⁶. Das Zytokin bindet an einen membran-ständigen Rezeptor, der aus zwei Untereinheiten den IL-22 Rezeptor 1 (IL-22R1) und den ubiquitär vorkommenden IL-10 Rezeptor 2 (IL-10R2) besteht^{107,108}. Der IL-22R ist als Heterodimer aufgebaut, der wiederum aus einer extrazellulären, transmembranen und intrazellulären Einheit besteht. Die extrazellulären Bestandteile des IL-22R1 und IL-10R2 setzen sich aus 2 Domänen zusammen, eine N-terminale D1 Domäne und eine D2 Domäne, die nahe der Membran positioniert ist. Die Bindung an den Rezeptorkomplex löst eine Signaltransduktion aus, die zur Genexpression- oder repression führen kann. Das Zytokin bindet an die extrazellulären Teile des IL-22R1 und nach einer Konformationsänderung im Zytokin bindet der Komplex an die extrazelluläre IL-10R2-Kette¹⁰⁹⁻¹¹². Zusätzlich gibt es einen löslichen Rezeptor das IL-22 Binde-Protein (siehe Kapitel 1.6), das IL-22 mit hoher Affinität bindet und die Interaktion mit dem membranständigen Rezeptor verhindert^{109,113-117}. In erster Linie aktiviert die Bindung an den membran-ständigen Rezeptor eine Januskinase, welche mit der IL-22R1 Untereinheit und signal transducers and activators of transcription (STAT)-Molekülen assoziiert ist¹¹⁸. Die Formation eines IL-22-IL-22R1-IL-10R2-Komplexes bewirkt eine Phosphorylierung und Aktivierung einer Tyrosinkinase, die wiederum für die Phosphorylierung von Tyrosinresten in der intrazellulären Domäne von IL-22R1 verantwortlich ist. STAT-Moleküle binden an die phosphorylierten Tyrosinreste mit Hilfe ihrer Src homology 2 (SH2) Domäne und werden von der aktivierten Januskinase phosphoryliert¹¹⁹. Hauptsächlich erfolgt eine Phosphorylierung von STAT3 an dem Tyrosinrest 705, jedoch werden auch in seltenen Fällen STAT1 und STAT5 Moleküle aktiviert^{92,120,121}. Die Modifikation der STAT-Moleküle bewirkt eine Dimerisierung und Translokation in den Zellkern zu den Zielgenen, die daraufhin reguliert werden. Zudem kann über die IL-22-IL-22R-Signaltransduktion auch eine Aktivierung von mitogenactivated protein kinases (MAPK) induziert werden, wie beispielsweise p38 und extracellular-signal regulated kinases (ERK)^{118,122,123}. Des Weiteren wurde beschrieben, dass ebenso Phosphoinositid-3-Kinasen stimuliert werden können¹²⁴.



Abbildung 1.3: IL-22 vermittelter Signalweg. IL-22 bindet an den heterodimeren IL-22-Rezeptorkomplex, bestehend aus den Untereinheiten IL-22R1 und IL-10R2. Nach einer Konformationsänderung werden die Kinasen JAK1 und TYK2, die auf der zytoplasmatischen Seite des IL-22 Rezeptors gebunden sind, phosphoryliert. Daraufhin werden Tyrosinreste, die sich an der zytoplasmatischen IL-22R1 Domäne befinden, ebenfalls phosphoryliert, wodurch eine Bindung von STAT3-Molekülen an den Rezeptor ermöglicht wird. Die Januskinasen aktivieren durch Phosphorylierung die STAT3-Moleküle, welche daraufhin dimerisieren, in den Zellkern translozieren und dort ihre Zielgene regulieren. Es können auch weitere Kinasen wie beispielsweise MAPK, AKT und der mTOR-Signalweg aktiviert werden. IL-22 kann auch von dem löslichen einkettigen Rezeptor IL-22BP gebunden werden, sodass die Bindung von IL-22 an den IL-22-Rezeptor verhindert wird, (modifiziert nach⁹⁴).

IL-22 erfüllt verschiedenste Funktionen: Beispielsweise induziert es die Produktion von antibakteriellen Proteinen wie S100A7 in bronchialen Epithelzellen und REG3γ in intestinalen Epithelzellen^{125,126}. Das Zytokin beeinflusst darüber hinaus die Proliferation, unterstützt die Regeneration und schützt dadurch vor übermäßigem Gewebeschaden¹²⁷. IL-22 reguliert ebenso die Genexpression von bestimmten Chemokinen, unter anderem CXCL1 und CXCL8 in Keratinozyten, und fördert somit die Migration von neutrophilen Granulozyten in die Haut¹²⁸. Zudem kann es die Differenzierung von Keratinozyten inhibieren und die Mobilität der Zellen durch die

Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen erhöhen^{129,130}. Zusätzlich unterstützt IL-22 unter entzündlichen Bedingungen die Mukusproduktion in der Darmschleimhaut und ist an der Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase beteiligt^{131,132}. Oftmals kann der Effekt von IL-22 durch andere Zytokine wie IL-17A oder TNF- α verstärkt werden^{133,134}. Das Zytokin besitzt während einer Gewebeschädigung überwiegend einen protektiven Einfluss, jedoch weist es in einigen Erkrankungen auch pro-inflammatorische Eigenschaften auf und kann überdies auch die Tumorprogression fördern^{80,123,135,136}. In der Leber exprimieren verschiedene Zelltypen wie Hepatozyten, Cholangiozyten, hepatische Sternzellen und hepatische Stammzellen den IL-22-Rezeptorkomplex. Während eines akuten Leberschadens induziert IL-22 die Produktion von Akute-Phase-Proteinen, verstärkt die Expression von mitogenen und anti-apoptotischen Genen und stimuliert die Bildung von Antioxidantien¹³⁷⁻¹⁴³. Das Zytokin schützt die Leber in verschiedenen akuten Krankheitsmodellen, indem es die Regeneration der Hepatozyten unterstützt, anti-inflammatorisch wirkt und oxidativen Stress vermindert¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. Allerdings spielt IL-22 auch eine pathogene Rolle in chronischen Lebererkrankungen und fördert mittels STAT3 Aktivierung die Tumorentwicklung in der Leber^{140,147,148}.



Abbildung 1.4: Rolle von IL-22 im Leberschaden. IL-22 schützt vor einem Leberschaden, indem es die

Regeneration durch die Aktivierung von mitogenen und anti-apoptotischen Proteinen in Hepatozyten und Progenitorzellen unterstützt. Weiterhin ist es an der Produktion von Antioxidantien beteiligt und vermindert somit den oxidativen Stress bei Hepatozyten. Darüber hinaus induziert IL-22 Akute-Phase-Proteine und weist anti-inflammatorische und antibakterielle Eigenschaften auf⁹⁴.

1.6 IL-22 Binde-Protein

IL-22 Binde-Protein (IL-22BP) ist ein löslicher Rezeptor, der keine transmembrane und intrazelluläre Domäne aufweist. Der Rezeptor neutralisiert IL-22 und besitzt eine 100-1000-fach höhere Affinität, das Zytokin zu binden, als der membranständige IL-22R1. Der IL-22-IL-22BP-Komplex ist sehr stabil und die Bindungsstelle zu IL-22R1 wird durch das Binde-Protein blockiert^{116,149}. Darüber hinaus scheint die Bindung spezifisch zu sein, sodass keine weiteren Mitglieder der IL-10 Familie, wie IL-19, IL-20 und IL-24, von IL-22BP gebunden werden^{113,115,117,150}. Das Gen Il22BP (Il22RA2) ist beim Menschen auf dem Chromosom 6 lokalisiert und bei der Maus auf dem Chromosom 10. Das einkettige Protein wird von einem IL-22R1-unabhängigem Gen kodiert und besitzt eine Länge von 210 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 25 kDA^{114,116,151}. Bisher sind im Menschen drei Isoformen (IL-22BPi1, IL-22BPi2 und IL-22BPi3) des Proteins bekannt, die durch alternatives Splicing entstehen. Währenddessen weisen Mäuse nur eine Isoform (IL-22BPi2) auf. IL-22BPi2 besitzt im Gegensatz zu IL-22BPi3 eine hohe inhibitorische Aktivität gegenüber IL-22. Retinsäure oder eine Aktivierung durch den Toll-like-Rezeptor 2 induziert in myeloiden Zellen die Expression von IL-22BPi2¹⁵². Das lymphatische und gastrointestinale System sowie Haut, Lungen, Leber und die weiblichen Geschlechtsorgane exprimieren das IL-22BP⁹⁴. Im Kolon wird das Protein zu einem großen Anteil von dendritischen Zellen produziert und die Expression wird während eines Gewebeschadens durch die Inflammasome NLRP3 und NRLP6 mittels Caspase-1 gesteuerter IL-18 Aktivierung herunterreguliert¹³⁶. Außerdem trägt IL-22BP, welches während einer aktiven chronischen Kolitis von CD4⁺ T-Zellen im Darm exprimiert wird, zur Verschlimmerung der Erkrankung bei und wird zusätzlich durch TNF- α indirekt reguliert¹⁵³. Darüber hinaus treten vermehrt ebenso eosinophile Granulozyten in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auf, die verstärkt das Binde-Protein produzieren und somit wiederum den protektiven Einfluss von IL-22 auf die Geweberegeneration blockieren könnten¹⁵⁴. Des Weiteren entwickeln IL-22BP-defiziente Mäuse in einem Kolonkarzinommodell aufgrund fehlender Kontrolle von IL-22 vermehrt Tumore¹³⁶. Die Rolle von IL-22BP in der Leber ist bisher noch weitestgehend unerforscht. Nach einer Studie von Sertorio et al., verstärken Mutationen, die die *Il22bp* Expression unterstützen, die Fibrose- und Zirrhoseentstehung in der Leber in Patienten mit Schistosomiasis und HCV-Infektionen¹⁵⁵. Hinzukommend wird IL-22BP nach einer Infektion mit *Schistosoma mansoni, Toxoplama gondii* und *Mycobacterium avium* im Mausmodell verstärkt in der Leber exprimiert¹⁵⁶.



Abbildung 1.5: Struktur des humanen IL-22/IL-22BP-Komplexes, modifiziert nach¹⁵⁷.

1.7 Tiermodelle eines akuten Leberschadens

1.7.1 Ischämie-und Reperfusionsschaden in der Leber

Der Ischämie-Reperfusionsschaden in der Leber ist eine häufige Komplikation bei Leberresektionen, Lebertransplantationen und hämorrhagischen Schock. In diesem Zusammenhang sind postoperative Organinsuffizienz und Transplantatdysfunktion oftmals die Folge¹⁵⁸. Während der Unterbrechung der Blutzufuhr (Ischämie) verursacht die entstehende Hypoxie im Leberparenchym einen ATP-Mangel. Die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien ist nicht mehr möglich, sodass ATP-abhängige Ionenpumpen (Na⁺, K⁺ und Ca²⁺-Pumpen) gehemmt werden. Die Akkumulation von intrazellulären Ionen führt zu einem Osmose-gesteuertem Zellödem und verursacht durch das Anschwellen der Hepatozyten eine Verengung der Blutgefäße. Eine weitere Schädigung erfolgt aufgrund der Laktatansammlung durch die anaerobe Glykolyse und

anschließende intrazelluläre Azidose^{159,160}. Der Ischämie-Reperfusionsschaden aktiviert Kupffer-Zellen, die reaktive Sauerstoffradikale freisetzen und somit gleichermaßen zur Schädigung von Membranbestandteilen und Zellproteinen beitragen. Darüber hinaus setzen Kupffer-Zellen pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine frei, die zur Aktivierung und Infiltration von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten führen^{161,162}. Infolgedessen werden Proteasen, hydrolytische Enzyme und Sauerstoffradikale in das Interstitium freigesetzt, die zur zusätzlichen Schädigung der beitragen¹⁶³. Des Leber Weiteren exprimieren verstärkt Endothelzellen Adhäsionsmoleküle, die das Anhaften von Leukozyten und Thrombozyten erleichtern und auf diese Weise die hepatische Mikrozirkulation zusätzlich einschränken^{164,165}. Diese pathophysiologischen Vorgänge werden durch verschiedene Faktoren beeinflusst und können schlussendlich zu einer nachhaltigen Organschädigung führen. Mit Hilfe experimentellen Durchführung eines Ischämie-Reperfusionsschaden der im Mausmodell ist es möglich, verschiedene molekulare und physiologische Mechanismen Zusammenhang mit vaskulären Pathologien, oxidativem Stress im und Entzündungsprozessen in vivo zu untersuchen¹⁶⁶.

1.7.2 Acetaminophen-induzierter Leberschaden

Acetaminophen (N-acetyl-p-aminophenol) auch bekannt als Paracetamol wird als Analgetikum und Antipyretikum weltweit eingesetzt. Die Cyclooxygenase 2 wird durch das Schmerzmittel maßgeblich gehemmt und somit Entzündungsreaktionen und Schmerzweiterleitung reduziert¹⁶⁷. Bei Überdosierung treten zum Teil erhebliche Leberschäden auf, die zu einem Leberversagen führen können. In pharmakologischen Dosen wird Acetaminophen durch Sulfatierung und Glukuronidierung in der Leber größtenteils eliminiert¹⁶⁸. In geringem Umfang erfolgt ein Abbau durch das Cytochrom-P450-Enzymsystem, wobei der toxische Metabolit N-Acetyl-p-Benzochinonimin (NAPQI) entsteht. Im weiteren Verlauf wird NAPQI mit dem in nur begrenzten Mengen verfügbaren Antioxidans Glutathion konjugiert und ausgeschieden. Überschüssiges NAPQI bindet hepatische Proteine, wodurch die Funktion der Mitochondrien gestört wird, oxidativer Stress entsteht und somit letztendlich Nekrose in den Hepatozyten induziert wird¹⁶⁹. Nekrotische Hepatozyten setzen spezifische Signalstoffe wie dangerassociated molecular patterns (DAMPs) frei, die Kupffer-Zellen zur Zytokinproduktion beispielsweise Interleukin-1 β sowie TNF- α und zur Chemokinfreisetzung aktivieren. Der darauffolgende Einstrom von pro-inflammatorischen Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten verstärkt das Ausmaß der Entzündung und des Gewebeschadens¹⁷⁰.

1.7.3 Partielle Hepatektomie

Die Leberresektion ist ein chirurgischer Eingriff, der vor allem im Rahmen der Entfernung von intrahepatischen Abszessen, Zysten, primären Tumoren sowie Metastasen erforderlich ist. Darüber hinaus erfolgt der Eingriff auch im Fall einer Leber-Lebendspende. Dabei löst ein Gewebeverlust von mindestens 9-12% den Regenerationsmechanismus in der Leber aus, sodass ausdifferenzierte Hepatozyten, die sich in der G₀-Phase befinden, in den Zellzyklus eintreten und proliferieren^{24,171}. Für eine Untersuchung der Leberregeneration wurde das Modell der partiellen Hepatektomie bereits 1931 von Higgins und Anderson in der Ratte entwickelt. Nach der Entfernung von zwei Drittel der Leber regeneriert sich das Organ im Nagetier innerhalb von 7 bis 15 Tagen durch das Wachstum der verbliebenen Leberlappen auf die funktionale ursprüngliche Größe¹⁷². Eine humane Leber benötigt für die Regeneration nach einer Resektion in etwa 6 Wochen. Mit Hilfe dieses Modells, welches 2003 das erste Mal in Mäusen durchgeführt wurde, ist es möglich den Regenerationsprozess ohne nekrotische Einflüsse und oxidativen Stress vorangegangene durch Gewebeschädigungen und Stoffwechselreaktionen zu untersuchen¹⁷³.

1.8 Mdr2 Knock-Out Mäuse (*Mdr2^{-/-}*) als Tiermodell eines chronischen Leberschadens

Im *Mdr2^{-/-}* Mausmodell entwickeln die Tiere eine spontane sklerosierende Cholangitis und infolge von Entzündungsprozessen findet eine Fibrosierung des Leberparenchyms statt. Als Konsequenz der inflammatorisch gesteuerten Fibrose bilden sich Zirrhosen aus, die im Verlauf die Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms begünstigen können. Das *multidrug resistence* gene *type 2* ist homolog zu dem humanen *multidrug resistence* gene *type 3* und kodiert die kanikuläre Phospholipid Flippase MDR2 (multidrug resistence 2 P-glycoprotein). Die Flippase transportiert biliäre Phospholipide in das Gallengangsystem, wodurch Gallensäuren in Form von Mizellen gebunden werden. Eine Mutation im *Mdr2* Gen induziert aufgrund des fehlenden Phospholipidtransports und der anschließenden Akkumulation von toxischen Gallensäuren eine Schädigung des Gallengangepithels und der Hepatozytenmembran¹⁷⁴⁻ ¹⁷⁶. Entzündungsvorgänge und die Hepatotoxizität der Galle verursacht eine Dysplasie der Hepatozyten, wodurch nach ca. 16 Monaten Lebertumore in den Tieren entstehen können¹⁷⁷.

1.9 Zielstellung der Doktorarbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der biologischen Funktion von IL-22 und seinem Inhibitor IL-22BP in sowohl akuten Lebererkrankungen als auch in der Hepatokarzinogenese. Die positiven Effekte von IL-22, insbesondere während der Wundheilung, in der Abwehr von Mikroorganismen und die Unterstützung der Proliferation von Epithelzellen, wurden bereits eingehend beschrieben. Das Zytokin wird vor allem nach einem Gewebeschaden von verschiedenen Immunzellen produziert und kann kontextabhängig nicht nur protektive sondern auch pathogene Eigenschaften aufweisen. Dagegen ist die Bedeutung von IL-22BP in der Regulation von IL-22 hinsichtlich verschiedener Lebererkrankungen noch weitestgehend unerforscht.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss von IL-22 und IL-22BP in drei akuten Leberschädigungsmodellen dem Ischämie-Reperfusionsmodell, in der Acetaminopheninduzierten Hepatoxizität und im Regenerationsprozess nach einer partiellen Hepatektomie untersucht. Hierfür wurden Knock-out Mauslinien verwendet, die eine gezielte Deletion von *Il22* und *Il22bp* aufwiesen. In diesem Zusammenhang sollte geklärt werden, welche mögliche Funktion das endogene IL-22 während der Regeneration nach einem akuten Leberschaden einnimmt. Des Weiteren sollte die Bedeutung von IL-22BP in der Regulation der IL-22-Aktivität analysiert werden. Darüber hinaus erfolgte eine Identifizierung der zellulären Quelle von IL-22 und IL-22BP vor und nach einem induzierten Leberschaden. Zudem soll der Wirkungsmechanismus von IL-22 während einer akuten Leberschädigung aufgeklärt werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Rolle von IL-22 und IL-22BP während der Hepatokarzinogenese untersucht. Dafür wurde ein Tiermodell verwendet, in der eine chronische Entzündung die Karzinombildung in der Leber auslöst. Für die Überprüfung der Funktion von IL-22 und IL-22BP in der Karzinogenese wurden *Mdr2^{-/-}* Mäuse mit *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Mäusen gekreuzt und die Tumorentwicklung in den jeweiligen Mauslinien analysiert. Darüber hinaus erfolgte eine Untersuchung von potentiellen Mechanismen, die eine veränderte Tumorentstehung beeinflussen können.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Instrumente

Gerätename	Geräteart	Hersteller
Premium no frost	Gefrierschrank -20°C	Liebherr-International AG (Bulle, Schweiz)
MDF-U5386S-PE	Gefrierschrank -80°C	Panasonic (Osaka, Japan)
Centrifuge 5427R	Zentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Centrifuge 5424R	Zentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Centrifuge 5810R	Zentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Centrifuge 5810	Tischzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
CUT 5062	Rotationsmikrotom	SLEE medical (Mainz)
C1000 Touch Thermo	Thermozykler	Bio-Rad (München)
Easypet 3	Pipettierhilfe	Eppendorf (Hamburg)
FACSAria III	Durchflusszytometer	BD Biosciences (Heidelberg)
Gel Doc TM XR	UV- Dokumentationsgerät	Bio-Rad (München)
Hera Safe	Zellkulturwerkbank	Haereus (Osterode)
IKAMAG RCT	Magnetrührer	IKA Manuals (Staufen)
Keyence BZ-9000	Mikroskop	Keyence (Neu-Isenburg)
Leica DM IL LED	Mikroskop	Leica (Wetzlar)
LSR FortessaII	Durchflusszytometer	BD Biosciences (Heidelberg)
MCO 19 AIC (UVH)	CO ₂ -Inkubator	Sanyo chemical industries (Moriguchi, Japan)

Micro centrifuge	Tischzentrifuge	Roth (Karlsuhe)
Mini-PROTEAN 3	System für vertikale	Bio-Rad (München)
Mini-Protean Tetra System	System für vertikale	Bio-Rad (München)
Moulinex comfort	Mikrowelle	Moulinex (Alencon, Frankreich)
MicroCam	Digitalkamera	dhs (Greifenstein- Beilstein)
NanoDrop 2000	Spektralphotometer	PEQLAB (Erlangen)
Neubauer-Zählkammer bright line	Hämozytometer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen)
рН 3110	pH-Meter	WTW (Weilheim)
PowerPac Basic	Netzgerät	Bio-Rad (München)
Power Supply Model	Netzgerät	Bio-Rad (München)
Power Supply Model	Netzgerät	Bio-Rad (München)
Practum	Waage	Sartorius (Haverhill)
Präparationsbesteck	chirurgische Präzisionsinstrumente	Fine Science Tools (Heidelberg)
Research Plus	Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Step One Plus	Real-Time PCR-Zykler	Applied Biosystems by life technologies GmbH (Darmstadt)
Thermomixer comfort	Schüttler	Eppendorf (Hamburg)
T100 Thermo Cycler	Thermozykler	Bio-Rad (München)
Vortex GENIE [®] 2	Schüttler	Scientific Industries (New York)
Wasserbad WNB	Wasserbad	Memmert GmbH & Co. KG (Schwabach)

Name	Hersteller
96-well Platten Nunc MaxiSorb	Thermo Fisher Scientific Inc.
Deckgläser 24 x 50 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen)
Einbettkasetten	Kabe Labortechnik (Nümbrecht)
Einfrierrörchen Cryo Pure Tubes	Sarstedt (Nümbrecht)
Einmalspritzen, 1 mL	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
Einmalspritzen 10 mL, 20 mL	BD Biosciences (Franklin Lakes,
Glaskapillaren	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim)
Insulinspritzen 0,5 mL	BD Biosciences (Franklin Lakes,
Kanülen 20 G	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
MicroAmp TM Optical Adhesive Film	Applied Biosystems by life technologies GmbH (Darmstadt)
Mikrotiterplatte für qRT-PCR MicroAmp Fast	Applied Biosystems by life
Optical 96-well plate	technologies GmbH (Darmstadt)
Mikrotom-Klingen S35	Feather Safety Razor Co.,LTD.
	(Osaka, Japan)
Nahtmaterial Mersilene 2-0	Ethicon (Norderstedt)
Petrischalen	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen (10 μL, 200 μL, 1000 μL)	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße 1,5 mL, 2,0 mL	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße 15 mL, 50 mL	Greiner bio-one (Frickenhausen)
Röhren, Flow Cytometry 5 mL	Sarstedt (Nümbrecht)
Serologische Pipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL)	Greiner bio-one (Frickenhausen)

2.1.2 Glas- und Kunststoffverbrauchsmaterialien

Super Frost Objektträger 75x25 mm	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG
Zellsieb, 40 μm, 100 μm Nylonsieb	BD Biosciences (Franklin Lakes,

2.1.3 Chemikalien

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

Name	Hersteller
Agarose	Axon (Kaiserslautern)
Betaisodona	Mundipharma GmbH (Limburg)
Bovine Serum Albumin (BSA)	Biomol (Hamburg)
Chloroform	J.T. Baker (Phillipsburg, USA)
DMEM Zellkulturmedium	Gibco [™] by life technologies (Darmstadt)
dNTP Mix	Thermo Fisher Scientific Inc. (Schwerte)
DreamTaq DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific Inc. (Schwerte)
10x DreamTaq [™] Green Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc. (Schwerte)
Ethanol	Th. Geyer (Hamburg)
Fetal Bovine Serum Gold (FBS)	GE Healthcare (Little Chalfont; UK)
Gene Ruler DNA ladder Mix	Thermo Fisher Scientific Inc. (Schwerte)
Glycergel Mounting Medium	Dako (Hamburg)
Hydrogen peroxide	Merck (Darmstadt)
Isopropanol	Th. Geyer (Hamburg)
Monensin	BioLegend (London, UK)

2.1.4 Substanzen

Natriumorthovanadat	AppliChem (Darmstadt)
Pacific Orange [™] Succinimidyl Ester	Life technologies (Darmstadt)
Page Ruler TM Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc. (Schwerte)
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen (Darmstadt)
Percoll TM	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Merck (Darmstadt)
Proteinase K recombinant	Roche (Basel, Schweiz)
Taq Man Fast Advanced Master Mix	Applied Biosystems by life technologies GmbH (Darmstadt)
Tissue Tek®	Sakura (Staufen)

2.1.5 Antikörper Western Blot

Primärer Antikörper	Beschreibung	Hersteller
β-Actin	polyklonaler Antikörper (Zielspezies: Maus, Wirtsspezies: Kaninchen)	Sigma (München)
Phospho-STAT3 (Tyr705)	polyklonaler Antikörper (Zielspezies: Maus, Wirtsspezies: Kaninchen)	Cell signalling (Cambrigde, UK)
STAT3	polyklonaler Antikörper (Zielspezies: Maus, Wirtsspezies: Kaninchen)	Cell signalling (Cambrigde, UK)
Sekundärer Antikörper	Beschreibung	Hersteller
swine anti-rabbit	polyklonaler Antikörper, konjugiert an	Dako (Hamburg)

HRP

Antikörper + Fluorochrom	Isotyp	Hersteller
CD3-AF 700	17A2	BioLegend (London, UK)
CD3-PE	<i>17A2</i>	BioLegend (London, UK)
CD4-APC Cy7	GK1.5	BioLegend (London, UK)
CD4-Pacific Blue	RM4-5	BioLegend (London, UK)
CD4-BV 570	RM4-5	BioLegend (London, UK)
CD8a-PE Cy7	53-6.7	BioLegend (London, UK)
CD11b-APC	M1/70	BioLegend (London, UK)
CD11b-APC Cy7	M1/70	BioLegend (London, UK)
CD11b-PE Cy7	M1/70	BioLegend (London, UK)
CD11c-PE Cy7	N418	BioLegend (London, UK)
CD11c-FITC	HL3	Becton Dickinson (Heidelberg)
CD45.2-APC	M1/70	Becton Dickinson (Heidelberg)
CD45.2-PE Cy7	104	BioLegend (London, UK)
F4/80-AF 488	CI:A3-1	BioLegend (London, UK)
Ly6c-PE	HK1.4	BioLegend (London, UK)
Ly6g-AF 647	1A8	BioLegend (London, UK)
Ly6g-BV 421	1A8	BioLegend (London, UK)
MHCII-PerCP	M5/114.15.2	BioLegend (London, UK)
MHCII-AF 700	M5/114.15.2	BioLegend (London, UK)
NK1.1-PE Cy7	PK136	BioLegend (London, UK)
IFNγ-APC	XMG1.2	BioLegend (London, UK)
IL-17A-AF 488	TC11-18H10.1	BioLegend (London, UK)
IL-22-PE	1H8PWSR	eBioscience (San Diego, USA)

2.1.6 Antikörper Durchflusszytometrie

NRRF-30	eBioscience (San Diego, USA)
GL3	BioLegend (London, UK)
GL3	BioLegend (London, UK)
	NRRF-30 GL3 GL3

2.1.7 Oligonukleotide

2.1.7.1 Oligonukleotide für die semiquantitative PCR

Genname	Sequenz
Il22	fwd 5'-TCA TCT GCT TGG TAC CAT GC-3'
	drev 5'-CAG AGA AAA TGG CAA GGC GG-3'
	LacZ 5'-GTC TGT CCT AGC TTC CTC ACT G-3'
Il22bp	fwd 5'-GGG GAC TTT GAC CAT GCA TC-3'
	drev 5'-CTA AGC AAG TGG CTG CCA GC-3'
	LacZ 5'-GTC TGT CCT AGC TTC CTC ACT G-3'
Mdr2	fwd 5'-CCA CAG CCA CAC ACT GAC CT -3'
	wt rev 5'-CAT CAA ACC ACG TGC AGA AAA-3'
	m rev 5'-CCA GAC TGC CTT GGG AAA AG -3'

2.1.7.2 TaqMan Gene Expression Assays

Die verwendeten Sonden wurden von der Firma Applied Biosystems (Carlsbad, USA) hergestellt.

Genname	Bestellnnummer	
Hprt	Mm03024075_m1	
<i>Il22</i>	Mm01226722_g1	
Il22ra2 (Il22bp)	Mm01192969_m1	
Il22ra1 (Il22r1)	Mm01192943_m1	
Cxcl10	Mm00445235_m1	
Cxcl1	Mm04207460_m1	
Cxcl11	Mm00444662_m1	
--------	---------------	
Cxcl12	Mm00445553_m1	
Cxcl13	Mm04214185_s1	
Ccl2	Mm00441242_m1	
Cxcl4	Mm00451315_g1	
Cxcl5	Mm00436451_g1	
Cxcl7	Mm00470163_m1	
Ccl7	Mm00443113_m1	
Cyp2e1	Mm00491127_m1	

2.1.8 Software

- BZ-II Analyzer, Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
- BZ-II Viewer, Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
- EndNote x6, Thomson Reuters, New York, USA
- FACSDiva 6, BD Pharmingen, Heidelberg
- FlowJo 10, FlowJo LLC, Ashland, OR, USA
- GraphPad PRISMR 6.01, GraphPad Software Inc., San Diego, USA
- ImageJ 1.48, NIH
- StepOnePlus[™] V2.1, Applied Biosystems by life technologies, Darmstadt
- Tbase, Abase, Gundelfingen, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Die *in vivo* Studien wurden in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Die Versuchsmäuse wurden unter konstanter Raumtemperatur von 20°C, spezifischen pathogen-freien Bedingungen mit Futter und Trinkwasser *ad libitum* gehalten. Die experimentelle Durchführung erfolgte nach Genehmigung der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz der Stadt Hamburg unter der Antragsnummer G100/12. Für die jeweiligen Versuche wurde Tiere im Alter von 8-12 Wochen verwendet. Während der Versuche erfolgte eine regelmäßige Kontrolle des Gesundheitszustandes der Tiere.

Linie	Beschreibung
C57Bl/6	Wildtyp, keine genetische Veränderung
1122	homozygote Deletion von Interleukin 22
Il22bp ^{-/-}	homozygote Deletion von Interleukin 22 binding-protein
Il22 ^{-/-} / Il22bp ^{-/-}	homozygote Deletion von Interleukin 22 und Interleukin 22 binding-protein
Il22 ^{-/-} /Mdr2 ^{-/-}	homozygote Deletion von <i>Interleukin 22</i> und des <i>Multidrug</i> <i>resistance gene 2</i> (keine Expression der Phospholipid-Flipase)
Il22bp ^{-/-} /Mdr2 ^{-/-}	homozygote Deletion von <i>Interleukin 22</i> und des <i>Multidrug</i> <i>resistance gene 2</i> (keine Expression der Phospholipid-Flipase)
Fir/Singer/IL22BFP (Reporter-Maus)	Knock-in von Genen für fluoreszierende Proteine im <i>Foxp3</i> , <i>Il17a</i> und <i>Il22</i> Locus (Foxp3-mRFP-KI; Il17a-eGFP-KI; Il22-sgBFP- KI)

Als Kontrolltiere dienten für IL-22 defiziente (*Il22^{-/-}*) und IL-22BP defiziente (*Il22bp^{-/-}*) Mäuse *Il22^{+/+}* und *Il22bp^{+/+}* Wurfgeschwister oder C57BL/6 Wildtyp (WT) Mäuse. Die verwendeten transgenen Mauslinien wurden auf den C57BL/6 Hintergrund gezüchtet und mittels semiquantitativer PCR genotypisiert.

2.2.1.1 Reportermäuse

Reportergene können mittels homologer Rekombination in einen gewünschten Genlokus eingeschleust werden. Dabei werden sie unter dem endogenen Promotor exprimiert. Die cDNA des fluoreszierenden Proteins wird in diesem Fall an eine ribosomale Eintrittsstelle (IRES) gekoppelt, sodass die Expression des endogenen Gens erhalten bleibt. Das Konstrukt wird mit einem Selektionsmarker Neomycin (Neo), welches mit LoxP-Erkennungssequenzen flankiert wurde, verknüpft. Zusätzlich wird noch ein weiterer Selektionsmarker das Thymidinkinase-Gen (tk) eingebaut. Das fertige Konstrukt wird anschließend zwischen dem Stopcodon (UGA) und dem Poly(A)-signal (A₂UA₃) des angesteuerten Gens eingefügt.



Abbildung 1.6: Schematische Darstellung einer Integration des rot fluoreszierenden Proteins (RFP) in das Foxp3-Gen, modifiziert nach¹⁷⁸.

2.2.1.2 Ischämie- und Reperfusionsschaden in der Leber

Zu Beginn der Operation wurde den Tieren 6 mg/kg KG Carprofen (Pfizer, New York, USA) als Schmerzmittel verabreicht und die Narkose mit Hilfe einer 3,0-4,0 Vol. %igen Isofluraninhalation (Forene®, Abbott GmbH, Wiesbaden) eingeleitet. Zum Schutz vor Austrocknung und Entzündung der Augen wurde zusätzlich eine Augensalbe aufgetragen. Nach allgemeiner Überprüfung von Schmerzreizen und Reflexen und unter vollständiger Reaktionslosigkeit wurde die Bauchdecke der Maus mittels Iod-Lösung desinfiziert. Unter einer Allgemeinanästhesie von 1,0-2,0 Vol. % Isofluran wurden die Versuchstiere auf einer Wärmeplatte fixiert und die Bauchhöhle mittels Laparotomie geöffnet. Die Blutversorgung des links-lateralen und medialen Leberlappens (partielle Ischämie von ca. 70% der Leber) wurde durch das Abklemmen der Arteria hepatica und der Pfortader für 60 min unterbrochen. Währenddessen wurde das offenliegende Abdomen mit Kochsalzlösung getränkten Kompressen vor dem Austrocknen geschützt und die Maus weiterhin warmgehalten. Nach Entfernen des Gefäßklipps wurde der hepatische Blutfluss wieder hergestellt und die Bauchdecke durch eine Haut- und Fasziennaht verschlossen. Die Reperfusionszeit betrug je nach Versuchsaufbau 6, 12 und 48 h. Anschließend wurden die Versuchstiere für die Blut- und Leberentnahme euthanisiert. Die Operationen wurden von Dr. Anastasios Giannou M.D. Ph.D. durchgeführt.

2.2.1.3 Acetaminophen-induzierter Leberschaden

Für eine Induktion eines reversiblen Leberschadens in den Versuchstieren wurde eine Dosis von 350 mg/kg verwendet. Den Tieren wurde zu Beginn des Versuchs für 16 h das Futter entzogen um einen relativ konstanten Glutathionspiegel zu gewährleisten. Danach wurden die Versuchsmäuse gewogen und abhängig vom Körpergewicht die jeweilige Menge Acetaminophen i.p. verabreicht. Anschließend hatten die Tiere wieder freien Zugang zu Futter und wurden je nach Versuchsaufbau nach 6 oder 48 h euthanasiert. Darauffolgend wurde Blut aus der *Vena cava* entnommen und die Leber herauspräpariert.

2.2.1.4 Partielle Hepatektomie

Wie bereits beschrieben (2.2.1.2) wurden die Versuchstiere auf die Operation vorbereitet und die Bauchhöhle geöffnet. Der links-laterale und mediale Leberlappen wurden durch eine basisnahe Ligatur mit Hilfe von Nahtmaterial an den zu- und abführenden Gefäßen abgebunden und anschließend entfernt. Im Anschluss wurde das Peritoneum und die Haut wieder verschlossen und die Versuchstiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten (2 und 6 Tage nach Operation) der Leberregeneration getötet und das Organ entnommen. Im Zeitraum von sieben Tagen (jeden zweiten Tag) wurde mit Hilfe von MRT-Untersuchungen die Volumenzunahme der Leber überwacht und dokumentiert. Die Untersuchungen fanden in der Abteilung für Interventionelle Radiologie am Uniklinikum Hamburg-Eppendorf statt und wurden unter der Anleitung von Dipl.-Phys. Thomas Michael Ernst und Dr.-Ing. Jan Henrik Dieckhoff durchgeführt. Die Versuchstiere wurden dafür mit Isofluran (1,0-2,0 Vol. %) narkotisiert, mit einer Wärmematte vor dem Auskühlen geschützt und die Atemfrequenz kontinuierlich überprüft. Nach einer ca. 10-minütigen Untersuchung wurden die Tiere in die Versuchstierhaltung zurückgebracht. Die Operationen wurden von Dr. med. Francis Jessica Huber durchgeführt.

2.2.1.5 Bestimmung der Alanin-Aminotransferase im Plasma

Das Vollblut wurde nach Versuchsende aus der *Vena cava inferior* entnommen und in einem Reaktionsgefäß aufgefangen. Anschließend wurde das Blut mit 5 µl EDTA (0,5 M pH 8) versetzt und bei 4°C für 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Das Plasma konnte als obere Phase entnommen werden und wurde für die Analyse 1:5 mit 1xPBS verdünnt (Endvolumen: 150 μ l). Die Blutentnahme am lebenden Tier wurde retroorbital mit Hilfe einer Mikropipette durchgeführt. Dabei wurde dem Versuchstier ca. 100 μ l Vollblut entnommen. Die Messung der Alanin-Aminotransferase erfolgte am Institut der Klinischen Chemie und Laboratoriumsmedizin am Uniklinikum Hamburg-Eppendorf.

2.2.2 DNA-Arbeitstechniken

2.2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Gewebe

Für die Genotypisierung der Mäuse wurden Schwanzbiopsien entnommen und das genetische Material aufgereinigt. Das Gewebe wurde über Nacht mit Proteinase K-Lysepuffer bei 55°C inkubiert. Im Anschluss wurde das Enzym für 15 min bei 95°C hitzeinaktiviert und 300 µl Aqua dest. zu den Proben hinzugefügt.

<u>Proteinase K-Lysepuffer:</u>	100 mM Tris
	5 mM EDTA
	200 mM NaCl
	0,2 % SDS
	ad H ₂ O pH 8

Anschließend wurden 3 µl Proteinase K (20 mg/ml) mit 80 µl Puffer vermischt und für den Verdau eingesetzt.

2.2.2.2 Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten der Gewebelysate nach dem Proteinase-K-Verdau wurden 2 µl der Proben eingesetzt. Alle PCRs wurden mit entsprechenden Thermozyklern durchgeführt. Der Kontrollansatz bestand aus allen beschriebenen Zusätzen mit Ausnahme von DNA. Der Reaktionsansatz für eine Amplifizierung wurde folgendermaßen angesetzt:

10x Dream Taq Green Buffer	1,47 µl
dNTPs (2mM)	0,29 µl
fwd Primer (10µM)	0,43 µl

rev Primer (10µM)	0,43 µl
Dream Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0,12 µl
DNA	2,0 µl
H ₂ O	10,26 µl
gesamt	15 µl

Das Programm zur Amplifizierung setzt sich aus folgenden Schritten zusammen:

	1	94°C	3 min	
	2	94°C	40 sec	
	3	65°C	40 sec	-0,3°C/cycle
	4	72°C	40 sec	
:	5	gehe zu 2 , (35x)		
	6	72°C	5min	
,	7	4°C	∞	

Anschließend wurden die amplifizierten DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.2.2.3 Auftrennung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Elektrophorese werden DNA-Moleküle aufgrund ihrer negativen Ladung in einem elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt. Die DNA wurde auf ein Agarosegel aufgetragen. Zur Herstellung des Gels wurde 1 % Agarose in 1x TBE-Puffer aufgekocht und mit 2µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Bei einer Spannung von 200-500 V liefen die Gele für ca. 20 min in einer mit TBE-Puffer gefüllten horizontalen Elektrophorese-Kammer. Zur Ermittlung der Fragmentgröße wurde ein entsprechender Längenstandard mitgeführt. Die Detektion des Bandenmusters erfolgte mit Hilfe einer UV- Dokumentationsanlage (Gel DocTM XR, BioRad).

<u>10x TBE- Puffer:</u> 0,9 M Tris/HCl

0,9 M H₃BO₃ pH 8.0 20 mM EDTA H₂O

2.2.3 RNA-Arbeitstechniken

2.2.3.1 RNA-Extraktion aus dem Gewebe

Die Proben wurden bei RT und unter Verwendung von RNase-freien Reagenzien und Verbrauchsmaterialien aufgearbeitet. Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurde das Lebergewebe in 1 ml phenolhaltigem TRIzol® Reagent (life technologies GmbH, Darmstadt) mit Hilfe eines Mikropistils homogenisiert. Für die RNA-Extraktion aus Zellen wurde TRIzol® LS Reagent (life technologies GmbH, Darmstadt) verwendet und zusätzlich jeweils 10 µl Glycogen (Roche, Schweiz) hinzugefügt. Die Auftrennung des Homogenat erfolgte nach Zugabe von 200 µl Chloroform. Die Proben wurden für je 1 min vermischt, für 2-3 min bei RT inkubiert und anschließend für 10 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Danach wurden 500 µl der oberen wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit jeweils 500 µl Isopropanol vermischt. Die Präzipitation der RNA erfolgte über Nacht bei -20 °C. Am darauffolgenden Tag wurden die Proben für 30 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert und im Anschluss der Überstand verworfen. Das RNA-Pellet wurde mit 700 µl 70% igem Ethanol gewaschen und für 10 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das RNA-Pellet getrocknet. Die aufgereinigte RNA wurde mit 30-100 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen, vermischt und für 5 min bei 55°C inkubiert. Zur Bestimmung der Konzentration wurde eine spektroskopische Messung (Nanodrop) durchgeführt und ein Teil der RNA für die cDNA Synthese verwendet. Die verbleibende RNA wurde bei -80 °C gelagert.

2.2.3.2 RNA-Aufreinigung

Die Aufreinigung von RNA aus Lebergewebe für die Sequenzierung erfolgte mit dem RNeasy[®] Mini Kit von Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben. Für eine Verbesserung der RNA-Qualität wurde zusätzlich ein DNase Verdau nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.3.3 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die optische Dichte (OD) der Nukleinsäure wurde durch eine photometrische Messung mit Hilfe des NanoDrop-Spektrometers (PeqLab, Erlangen) bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt. Als Referenzprobe diente RNase freies H₂O. Um Aussagen über die Reinheit der RNA treffen zu können, wurde das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} aufgenommen, da Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280 nm besitzen. Dieses Verhältnis lag im Bereich der optimalen Reinheit von 1,8.

2.2.3.4 RNA-Sequenzierung

Mit Hilfe der RNA-Sequenzierung wird die Nukleotidabfolge der RNA bestimmt und liefert somit Informationen über die Genexpression und posttranskriptionelle Modifikationen. Die Methode gibt darüber Aufschluss welche Gene unter bestimmten experimentellen Bedingungen aktiviert werden. Dafür wurde die RNA aufgereinigt und anschließend von der Firma Novogene weiterverarbeitet. Die Analyse der Daten wurde von der Bioinformatikerin Babett Steglich durchgeführt.

2.2.3.5 Reverse Transkription

Die zuvor aufgereinigte RNA wurde mittels reverser Transkription unter Verwendung des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems by life technologies GmbH, Darmstadt) und des RiboLock RNase Inhibitors (Thermo Scientific) in cDNA trankribiert. Der Reaktionsansatz wurde wie folgt angesetzt:

10x RT-Puffer	2,0 µl
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
10x RT Random Primer	2,0 µl
RNase-Inhibitor (20 U/µl)	0,5 µl
MultiScribe TM Reverse Transcriptase (50 U/µl)	1,0 µl
RNA	2,0 µg
RNase freies H ₂ O	ad 20 ul

Der Ansatz wurde nach folgendem Protokoll in einem Thermozykler inkubiert, sodass

die cDNA für die Amplifizierung sequenzspezifischer Bereiche eingesetzt werden konnte.

Temperaturprogramm:

1	25°C	10 min
2	37°C	120 min
3	85°C	5 min
4	4°C	∞

2.2.3.6 Quantitative Real-time PCR

Die Genexpressionsanalysen wurden mit TaqMan[®] Gene Expression Assays (Applied biosystem, Darmstadt) durchgeführt. Mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen wurde die Zunahme der Target-DNA von Zyklus zu Zyklus erfasst. Die verwendete Sonde wird an einem Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und am anderen Ende mit einem Quencher, der die Fluoreszenzemission unterdrückt, markiert. Während der Elongation, nachdem die Sonde an den komplementären DNA-Strang gebunden hat, erfolgt die Degradierung der Sonde durch die Taq Polymerase wobei der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt wird. Der Quencher ist nun nicht mehr nicht in der Lage die Fluoreszenzemission zu unterdrücken und das Signal wird in Echtzeit mit Hilfe des Real Time StepOnePlus[™] System (Applied Biosystem) in einer 96-well Mikrotiterplatte (MicroAmp Fast Optical 96-well plate, Applied Biosystem) gemessen. Ein Reaktionsansatz sah folgendermaßen aus:

PCR-Master-Mix	2,5 µl
TaqMan Primer Probe	0,25 µl
cDNA	1 µl
ddH ₂ O	1,25 µl
Gesamt	5 µl

Temperaturprogramm:

1	95°C	0:20 min		
2	95°C	0:01 min	x 40	

Von jeder RT-PCR-Probe wurde ein Duplikat angefertigt und zusätzlich ein Referenzgen (*Hprt*) für die relative Quantifizierung sowie entsprechende Leerkontrollen mitgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der $\Delta\Delta$ ct-Methode.

2.2.4 Protein-Arbeitstechniken

2.2.4.1 Proteinextraktion aus dem Zelllysat

Nach Entnahme der Leber wurde ein Teil des Organs mit Hilfe von Lysispuffers (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) zerkleinert und anschließend bei 4°C für 10 min zentrifugiert (13000 g). Der Überstand mit den gelösten Proteinen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

<u>Lysispuffer-Puffer:</u>	10 ml T-Per Tissue Protein Extraction Reagent
	10 mM Benzamidin
	2 mM Natriumorthovanadat
	1 µg/mL Leupeptin
	1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid
	1 μg/mL Aprotinin
	2 mM EDTA
	10 mM Natriumfluorid

2.2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für eine quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration aus dem Gewebelysat wurde eine spektralphotometrische Messung mit Hilfe des Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) vorgenommen. Die Proteinquantifizierung erfolgt durch eine Biuretreaktion, wobei Cu(II)-Ionen in Verbindung mit Peptidbindungen in alkalischer Lösung zu Cu(I)-Ionen reduziert werden. Im zweiten Reaktionsschritt bildet Bicinchoninsäure mit Cu(I)-Ionen einen Chelatkomplex. Dieser wasserlösliche Komplex zeigt ein Absorptionsmaximum bei 562 nm und kann mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Lesegeräts analysiert werden. Nach Herstellung des Proteinstandards (BSA-Lösung, Endkonzentration: 0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 μg/ml) wurden jeweils 10 μl der Probe und des Standard in der 96-well Mikrotiterplatte vorgelegt und mit jeweils 200 μl Reaktionsgemisch (Reagenz A + Reagenz B, 51 : 1 Verdünnung) für 30 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Abschließend erfolgte die Messung der Farbintensität mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät. Anhand der ermittelten Standardkurve wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen der Größe nach erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE. Die Proteinlysate (50 µg) wurden mit 4 µl 5x Laemmli-Puffer vermischt und auf ein Gesamtvolumen von 20 µl mit A. dest. eingestellt. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 95 °C denaturiert und auf ein Zweiphasen-SDS-Polyacrylamidgel geladen. Die erste Phase (Sammelgel) diente zur Aufkonzentrierung der Proteine, sodass in der zweiten Phase (Trenngel) die Auftrennung nach dem Molekulargewicht erfolgte. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels richtete sich entsprechend nach der jeweiligen Proteingröße. Die Gele liefen zuerst für 10-15 min bei 100 V und anschließend für 1-2 h bei 160 V in 1x SDS-Laufpuffer in einem Mini-Protean 3-System (BioRad, München).

<u>5x Laemmli-Puffer:</u>	250 mM Trisbase	
	10% SDS	
	0,5% Bromphenolblau	
	50% Glycerol	
	0,5 M DTT	
	H ₂ O	
<u> 10x SDS-Laufpuffer:</u>	60,6 g Tris	
	288 g Glycin	
	20 g SDS	
	ad 2 L H ₂ O	
<u>Trenngel (12%):</u>	H_2O	2,4 ml
	1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml

	10% SDS	0,1 ml
	Acrylamid (40%)	3 ml
	Glycerol	2 ml
	TEMED	12,5 µl
	30% Ammoniumpersulfat	25 µl
Sammelgel:	H_2O	7,4 ml
	0,5 M Tris pH 6,8	1,25 ml
	10% SDS	100 µl
	Acrylamid (40%)	1,25 ml
	TEMED	10 µl
	30% Ammoniumpersulfat	20 µl

2.2.4.4 Western Blot und Immunodetektion

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden aus dem Trenngel durch das wetblotting-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran (Merck, Darmstadt) mittels Mini-Protean Tetra System (BioRad, München) transferiert. Der Blotvorgang erfolgte je nach Proteingröße für 1 h bei 300 mA. Zur Reduzierung unspezifischer Bindungen des Antikörpers wurde die Membran in Blockpuffer (5% BSA gelöst in 1x TBS mit 0,05% Tween-20) für 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Über Nacht erfolgte die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper, der in Blockpuffer nach Angaben des Herstellers verdünnt wurde. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran nach vier Waschschritten (je 5 min in TBS/0,05% Tween-20) mit dem in Blockpuffer verdünnten HRP-konjugiertem Sekundärantikörper (Verdünnung nach Herstellerangaben) für 1 h bei RT inkubiert. Zuletzt wurde die Membran nochmals gewaschen (4 x TBS/0,05% Tween-20, je 5 min) und anschließend mit dem LumiSensor Chemiluminescent HRP Substrate (GenScript, Piscataway, USA) behandelt. Der zweite Antikörper, der mit einem Enzym gekoppelt war, setzte das ECL-Substrat unter Freisetzung von Chemolumineszenz um, sodass die markierten Proteine mit einem Röntgenfilm (Fujifilm, Tokio, Japan) detektiert werden konnten. Die Entwicklung des Films erfolgte im Curix 60 (AGFA Health Care, Deutschland).

<u> 10x Transferpuffer:</u>	144 g Glyzin
	30,3 g Trisbase
	ad 1 L H ₂ O
<u>1x Transferpuffer:</u>	100 ml 10x Blotpuffer
	200 ml Methanol
	700 ml H ₂ O
<u> 10x TBS-Puffer:</u>	24,22 g Trisbase
	175,32 g NaCl
	2000 ml Aqua dest.
	рН 7,6

2.2.5 Histologie

2.2.5.1 Präparation der Organe

Nach Versuchsende wurde die Leber der Versuchstiere mit PBS gespült und herauspräpariert. Zur Anfertigung der Paraffinschnitte wurde ein Teil des Organs über Nacht bei 4°C in 4% iger gepufferter Formalinlösung gelagert. Die Entwässerung und Einbettung der Organe in Paraffin erfolgte am Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Nach der Einbettung der Organe wurden am Mikrotom 3 µm dicke Schnitte hergestellt und auf einem Objektträger fixiert.

2.2.5.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung von Paraffinschnitten

Hämatoxylin färbt alle basischen Strukturen unter anderem Zellkerne und DNA blau an. Dagegen werden basische Strukturen wie Proteine und Zytoplama durch Eosin rot eingefärbt. Nach Einbetten der Organe in Paraffin wurden die am Mikrotom angefertigten Schnittpräparate nach folgendem Protokoll gefärbt:

Schritt	Reagenz	Zeit (Minuten)
1	Xylol	5:00
2	Xylol	5:00
3	100% Ethanol	2:00

4	90% Ethanol	2:00
5	70% Ethanol	2:00
6	50% Ethanol	2:00
7	VE-H ₂ O	1:00
8	Hämalaun	0:30
9	fließendes Leitungswasser	10:00
10	VE-H ₂ O	2:00
11	Eosin 2%	1:00
12	VE-H ₂ O	1:00
13	50% Ethanol	0:30
14	70% Ethanol	1:00
15	90% Ethanol	1:00
16	100% Ethanol	2:00
17	Xylol	3:00
18	Xylol	3:00

Nach der Behandlung mit Xylol wurden die Schnitte mit Eindeckmedium fixiert und unter dem Durchlichtmikroskop ausgewertet.

2.2.5.3 Ki-67 Färbung

Zum Nachweis von proliferierenden Hepatozyten wurde der Ki-67 Antikörper (BD Pharmingen) verwendet. Ki-67 ist ein Protein, welches während der aktiven Phase des Zellzyklus (G(1)-, Synthese-, G(2)- und Mitosephase) im Zellkern nachgewiesen werden kann. Mit Hilfe von Xylol wurden die Paraffin-fixierten Organschnitte entparaffiniert (2 x 10 min) und anschließend einer absteigenden Alkoholreihe unterzogen (jeweils 2 min 2 x 100%, 1 x 95%, 1 x 80% und 1 x 70%). Danach wurden die Schnitte unter fließendem VE-H2O gespült. Zusätzlich wurden die Schnitte mit Citratpuffer in der Mikrowelle bei 600 W (1 x 4 min, 4 x 3 min) vorbehandelt. Nach dem Abkühlen der Präparate bei RT wurden die Schnitte mit TBS gespült (2 x 2 min). Der Peroxidaseblock erfolgte für 20 min bei RT mit Hilfe einer 3%igen Wasserstoffperoxidlösung. Im Anschluss wurden die Schnitte erneut für 5 min mit VE-H₂O gespült und in TBS überführt. Zur Verminderung unspezifischer Bindungen des Antikörpers wurden die Organschnitte mit einer Blocklösung (5% FBS und 10% BSA in PBS) für 20 min bei RT inkubiert. Nach kurzem Spülen mit TBS erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers (1:50 verdünnt in TBS) für 1 h bei RT. Darauffolgend wurden die Schnitte 2 x 2 min mit TBS gewaschen und für 30 min bei RT mit der Envision HRP ready to use Lösung (DAKO, Glostrup, Dänemark) weiterbehandelt.

Anschließend wurden die Präparate 2 x 2 min mit TBS gespült und für 15 min bei RT mit DAB Chromogen (1:50 verdünnt in Substrat-Puffer) (DAKO, Glostrup, Dänemark) inkubiert. Nach gründlichem Spülen in TBS und VE-H₂O wurde das Anfärben der Zellkerne mit Hämalaun nach Mayer für 20 sec durchgeführt. Abschließend wurden die Schnitte für 5 min mit Leitungswasser gewaschen und mit Eindeckmedium fixiert.

<u>1x PBS:</u>	2,7 mM KCl
	1,5 mM KH ₂ PO ₄
	137 mM NaCl
	6,5 mM Na ₂ HPO ₄
	ad VE-H ₂ O pH 7,4

Citrat-Puffer:

10 mM Citrat, pH 6 ad 1L VE-H₂O

2.2.5.4 TUNEL-Methode

Mit Hilfe der TUNEL-Methode ist es möglich Zellkerne apoptotischer Zellen darzustellen. Während der Apoptose wird der DNA-Strang durch Endonukleasen fragmentiert und daraufhin die freiwerdenden Hydroxygruppen mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden sichtbar gemacht. Für den Nachweis wurde das In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche, Rotkreuz, Schweiz) verwendet. Zu Beginn wurden die Organpräparate mit folgendem Protokoll entparaffiniert und anschließend mit absteigender Alkoholreihe rehydriert.

Schritt	Reagenz	Zeit (Minuten)
1	Xylol	5:00
2	Xylol	5:00
3	100% Ethanol	5:00
4	90% Ethanol	2:00
5	70% Ethanol	2:00
6	50% Ethanol	2:00
7	VE-H ₂ O	5:00

Für den Proteinverdau wurden die Schnitte für 30 min bei 37°C mit Proteinase K-Lösung inkubiert und anschließend mit PBS (2 x 2 min) gewaschen. Des Weiteren wurde der Enzym-Label-Mix (1:10 Verdünnung) (Roche, Schweiz) auf die Präparate aufgetragen und für 60 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Zum Abschluss erfolgte nach dem Spülen mit PBS (3 x 2 min) die Zellkernanfärbung und das Eindecken mit dem DAPI-Farbstoff enthaltendem ProLong® Gold Eindeckmittel (Thermo Fisher Scientific, Schwerte).

<u>Proteinase K-Lösung:</u>	Proteinase K (10-20 µg/ml)
	10 mM Tris/HCl pH 7,4 - 8

2.2.6 Durchflusszytometrie

2.2.6.1 Isolation von Lymphozyten und Antigenpräsentierenden Zellen aus der Leber

Vor der Organentnahme wurde die Leber mit 5 ml 1x PBS perfundiert und in 10 ml DMEM-Zellkulturmedium mit 10% FBS aufbewahrt. Anschließend wurde das Gewebe mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein Metallsieb (230 µm) gerieben und in 50 ml 1x PBS/1% FBS auf Eis aufgenommen. Die Zellsuspension wurde bei 1400 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Währenddessen erfolgte die Vorbereitung des PercollTM-Gradienten. Dafür wurde zuerst eine 90%ige PercollTM-Lösung mit 10x PBS hergestellt und daraus eine 40 und 67%ige PercollTM-Lösung vorbereitet. 4ml der 67 %igen PercollTM-Lösung wurden je Leberprobe in einem 15 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Das Zellpellet wurde in einer 4 ml 40%igen PercollTM-Lösung resuspendiert und vorsichtig auf die 67%ige PercollTM-Lösung pipettiert. Im Anschluss wurde nie Proben mit 400 rcf für 20 min bei RT ohne Bremse zentrifugiert. Die Interphase wurde abgenommen und die Zellen mit 50 ml 1x PBS/1% FBS bei 1400 rpm für 10 min gewaschen. Das Pellet wurde in 1 ml 1x PBS/1% FBS resuspendiert und die Zellzahl unter dem Mikroskop bestimmt.

2.2.6.2 Zellzahlbestimmung mit Trypanblaufärbung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau vermischt. Etwa 10 µl wurden auf eine Neubauerzählkammer aufgetragen und die nicht angefärbten, vitalen Zellen in allen vier Feldern der Zählkammer mit Hilfe des Mikroskops ausgezählt. Mit folgender Formel konnte die Anzahl der Zellen pro ml

errechnet werden:

Zellzahl (aller 4 Felder)/4*2*10.000 = x Zellen pro ml

2.2.6.3 Restimulation von Zellen

Für die Analyse des Zytokinexpression in den T-Zellen wurden die Zellen vor der intrazellulären Zytokinfärbung mit Hilfe von PMA (500 ng/ml), Ionomycin (500 ng/ml) und Monensin (2 μM) in 1 ml DMEM Zellkulturmedium mit 10% FBS für 3 h bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% inkubiert. PMA ist dafür verantwortlich die Proteinkinase C zu aktivieren, während Ionomycin, ein Ionophor die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöht. Monensin verhindert bei der Stimulation die Sekretion der Zytokine in den extrazellulären Raum. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml 1x PBS/1% FBS bei 1500 rpm für 5 min gewaschen.

2.2.6.4 Färbung extrazellulärer Oberflächenmarker

Die Zellen wurden in 5 ml Röhrchen überführt und anschließend mit 2 ml 1x PBS/1% FBS bei 1500 rpm für 5 min gewaschen. Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern, erfolgte für 10 min eine Inkubation mit einem Fc-Block (1:00). Nach Zugabe des Antikörpermix (Verdünnung von 1:200 bis 1:1000 je nach Antiköper) wurden die Proben für 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 1 ml 1x PBS/1% FBS bei 1500 rpm für 5 min gewaschen und der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden in 300 µl 1x PBS/1% FBS aufgenommen und entweder für die Analyse am Durchflusszytometer auf Eis im Dunkeln aufbewahrt oder für die intrazelluläre Zytokinfärbung weiterverwendet.

2.2.6.5 Lebend/tot Färbung von Zellen für die Durchflusszytometrie

Um für die Analyse lebende von toten Zellen unterscheiden zu können, wurden die Zellen mit 500 µl 1x PBS gewaschen und anschließend die Zelloberfläche mit 200 µl Pacific Orange Succimidyl Ester inkubiert (Stammlösung 1,34 mM, 1:1000 Verdünnung). Der Farbstoff bindet freie Amine in toten Zellen, während Zellen mit intakter Zellmembran nicht angefärbt werden. Nach einer Inkubation von ca. 25 min lichtgeschützt auf Eis wurden die Zellen zweimal mit 1 x PBS bei 1500 rpm für 5 min gewaschen und anschließend für die Analyse am Durchflusszytometer verwendet.

2.2.6.6 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Für die intrazelluläre Färbung von IFN γ , IL-17A und IL-22 wurden die aufbereiteten Zellen (siehe 2.2.6.3 und 2.2.6.4) mit 100 µl 4% PFA für 20 min bei RT fixiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 1 ml 1 x PBS bei 1500 rpm für 5 min gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 100 µl Permeabilisierungspuffer (0,1% NP-40 in 1 x PBS) für 4 min bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt wurden die Zellen in 100 µl Antikörperlösung (1:80 bis 1:100 Verdünnung je nach Antikörper in 1 x PBS) über Nacht im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Am folgendem Tag wurden die Zellen mit 1 ml 1x PBS bei 1500 rpm für 5 min gewaschen und in 300 µl 1x PBS für die durchflusszytometrische Messung resuspendiert.

2.2.6.7 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Zellen anhand ihrer Größe, Granularität und Oberflächenmoleküle analysiert werden. Zellen werden von einem Laser erfasst und die jeweilige Streuung des Lichtes gibt Aufschluss über Größe und Granularität der einzelnen Zellen. Bei dem Verfahren ist es möglich Fluoreszenzmarkierte Zellen mittels Laserlicht anzuregen und das emittierte Licht der Fluorochrome wird detektiert. Fluorochrom-gekoppelte Antikörper binden an intrazelluläre Zytokine oder Oberflächenproteine und können so Auskunft über Identität und Eigenschaften der Zellen geben. Für die Analyse von mehrfach gefärbten Proben wurden Einzelfärbungen der Zellen als Kontrolle angefertigt, sodass die Fluoreszenzkänale gegeneinander kompensiert werden konnten. Isotypkontrollen dienten zur Ermittlung der Hintergrundfluoreszenz der jeweiligen Antikörper. Tote Zellen und Dubletten wurden vorher von der Auswertung ausgeschlossen. Die Analyse der Messergebnisse erfolgte mit der Software FlowJo10.

Darüber hinaus ist es möglich mit Hilfe eines Zellsortierers (fluorescence activated cell sorting, "FACS") einzelne Zellpopulationen nach ihrer Beschaffenheit zu sortieren. Fluoreszenz-markierte Zellen werden je nach Fluoreszenzintensität, die mit Hilfe der Detektoren erfasst wird, durch elektrische Impulse aufgeladen und anschließend durch ein elektrisches Feld geleitet. Dabei werden die Zellen abgelenkt und in ein Reaktionsgefäß sortiert.

3 Ergebnisse

Mehrere Studien haben gezeigt, dass IL-22 einerseits einen protektiven Effekt auf die Leberregeneration aufweist, andererseits die Tumorentwicklung in der Leber fördern kann^{140,144,147}. Diese Daten lassen eine duale Funktion von IL-22 vermuten und legen somit nahe, dass die Aktivität von IL-22 kontrolliert werden muss. Allerdings ist unklar welche Rolle der endogene Inhibitor IL-22BP bei dieser Kontrolle spielt.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Expression und der Effekt von IL-22 und IL-22BP in verschiedenen akuten Leberschädigungsmodellen untersucht. Hierzu wurden unter anderem Tiere verwendet, in denen die Gene *Il22* und *Il22bp* jeweils im gesamten Organismus deletiert wurden. Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Funktion von IL-22 und IL-22BP in einem Leberkarzinommodell untersucht. Dabei wurden *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* mit *Mdr2^{-/-}* Tiere gekreuzt und die Tumorentwicklung in den Tieren mit Hilfe des MRT überwacht.

3.1 Die Rolle von IL-22 und IL-22BP im akuten Leberschaden

3.1.1 Ischämie- und Reperfusionsmodell (IR)

3.1.1.1 Regulation von Il22, Il22bp und Il22r1 während eines IR-induzierten Schadens Für dieses Experiment wurde in Wildtypen ein IR-Schaden induziert und nach 0, 6 und 48 h die RNA-Expression von Il22, Il22bp und Il22r1 im Lebergewebe mittels RT-PCR analysiert. Vor dem Leberschaden ist keine Il22 Expression nachweisbar, allerdings wird 6 h nach IR Il22 aktiviert und die Genexpression hochreguliert. Nach 48 h ist die RNA-Expression immer noch detektierbar. Das Expressionsmuster von Il22bp und Il22r1 bleibt sowohl vor als auch nach dem IR-Schaden unverändert (Abb. 3.1).





Abbildung 3.1: Genexpressionsanalyse von hepatischen *Il22*, *Il22bp* und *Il22r1* mittels RT-PCR von unbehandelten Wildtypen sowie 6 und 48 h nach IR-Schaden. Angaben +/- SEM; n = 5-9.

3.1.1.2 Einfluss von IL-22 und IL-22BP auf den Ischämie- und Reperfusionsschaden in der Leber

Für die Untersuchung des Effekts von IL-22 und IL-22BP wurden $Il22^{-/-}$ und $Il22bp^{-/-}$ Tiere, sowie Wildtypen als Kontrolltiere, verwendet. Das Ausmaß des Leberschadens wurde zum einen mit Hilfe der Messung des leberspezifischen Enzyms Alanin-Aminotransferase (ALT) aus dem Plasma und zum anderen anhand des Nekrosestatus mittels histologisch H&E gefärbter Leberpräparate ermittelt. Die Messung der Transaminasen 6 h nach IR zeigte erhöhte ALT-Werte in den $Il22bp^{-/-}$ Tieren im Vergleich zu den $Il22^{-/-}$ Tieren. Die Kontrollgruppe wies jedoch keinen Unterschied zu den $Il22^{-/-}$ und $Il22bp^{-/-}$ Tieren auf. Auf Grund der schnellen Regeneration der Leber konnten bereits nach 48 h relativ niedrige ALT-Spiegel in allen drei Gruppen ermittelt werden. Jedoch wurden weiterhin signifikant erhöhte ALT-Werte in den $Il22bp^{-/-}$ Tieren im Vergleich zu der Kontrollgruppe und den $Il22^{-/-}$ Tieren nicht signifikant verschieden (Abb. 3.2).



Abbildung 3.2: Nachweis der Alanin-Aminotransferase in Wildtypen, $II22^{-/-}$ und $II22bp^{-/-}$ Tieren 6 und 48 h nach IR-Schaden. Die Daten zeigen Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten. Angaben +/-SEM; n = 8-13; * p = < 0,05.

Die histologischen Untersuchungen zeigten in den *Il22bp^{-/-}* Tieren 6 h nach IR-Schaden im Vergleich zu den Wildtypen und *Il22^{-/-}* Tieren große Areale mit nekrotischem Lebergewebe. Nekrotische Bereiche der Leber sind durch die zerstörte Morphologie des Leberparenchyms gekennzeichnet, insbesondere Zellstrukturen wie Zellkerne und Zellgrenzen der Hepatozyten sind nicht mehr erkennbar. Die Quantifizierung der Nekroseläsionen bestätigten die Ergebnisse der ALT-Werte. *Il22bp^{-/-}* Tieren wiesen nach 6 h bis zu 95% geschädigte Leberareale in den betroffenen Leberlappen auf. In den Wildtypen und *Il22^{-/-}* Tieren waren signifikant weniger Bereiche der Leber von Nekrose betroffen. 48 h nach IR-Schaden zeigten die *Il22bp^{-/-}* Tieren und Wildtypen (Abb. 3.3).



6 h nach IR



Abbildung 3.3: (A) Repräsentative mikroskopische Aufnahme von H&E gefärbten Leberpräparaten 6h nach IR-Schaden. Quantifizierung der Nekroseläsionen mittels ImageJ. (B) Repräsentative mikroskopische Aufnahme von H&E gefärbten Leberpräparaten 48 h nach IR-Schaden in Wildtypen, $II22^{-/-}$ und $II22bp^{-/-}$ Tieren und Quantifizierung der Nekroseläsionen. Die Daten zeigen Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten. Angaben +/- SEM; n = 7-12; * p = < 0,05.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass das Fehlen von IL-22BP im Vergleich zu der Kontrollgruppe und den *Il22^{-/-}* Tieren eine signifikant stärkere Nekrose in den betroffenen Leberlappen nach einem IR-Schaden auslöste. 48 h nach IR-Schaden wurden weiterhin stark erhöhte ALT-Werte und große Areale mit Nekrose in den Lebern der *Il22bp^{-/-}* Tiere im Gegensatz zu den anderen Gruppen nachgewiesen.

3.1.1.3 Nachweis eines IL-22 abhängigen Effekts der Leberschädigung in den Il22bp^{-/-} Tieren

Für die Überprüfung eines IL-22 abhängigen Effekts wurden in einem Experiment die ALT-Werte und das Ausmaß der Nekrose in den *Il22^{-/-}* und *Il22^{-/-}/Il22bp^{-/-}* Tieren nach einem IR-Schaden ermittelt. Die im Plasma gemessenen Transaminasen zeigten 6 und 48 h nach Induktion des Leberschadens keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. Das Ergebnis ließ sich auch histologisch bestätigen. Nach mikroskopischer Auswertung des Lebergewebes waren prozentual ähnlich große Flächen von Nekrose betroffen (Abb.3.4).



48 h nach IR



Abbildung 3.4: (A) ALT-Messung nach 6 und 48 h nach IR-Schaden in $Il22^{-/-}$ und $Il22^{-/-}/Il22bp^{-/-}$ Tieren. (B) Repräsentative mikroskopische Aufnahme von H&E gefärbten Leberpräparaten 48 h nach IRvermitteltem Leberschaden in $Il22^{-/-}$ und $Il22^{-/-}/Il22bp^{-/-}$ Tieren. Quantifizierung der Nekroseläsionen mittels ImageJ. Angaben +/- SEM; n = 6.

Diese Ergebnisse beweisen, dass die verstärkte Leberschädigung in den *Il22bp^{-/-}* Tieren von IL-22 abhängig ist. Beide Versuchsgruppen weisen eine ähnliche verminderte Zerstörung des Leberparenchyms auf. Wenn der Effekt von IL-22BP unabhängig von IL-22 wäre, müsste der Schaden in den *Il22^{-/-}/Il22bp^{-/-}* Tieren stärker ausgeprägt sein als in den *Il22^{-/-}* Tieren (Abb. 3.2, 3.3 und 3.4)

3.1.1.4 Untersuchung der Proliferationsrate und des Ausmaßes an apoptotischen Hepatozyten nach IR-Induktion

Hepatozyten Die Detektion proliferierender erfolgte mit Hilfe eines immunhistochemischen Nachweises von Ki-67 positiven Zellen in paraffinierten Leberpräparaten (siehe 2.2.5.3). Ki-67 positiv gefärbte Hepatozyten zeigen eine braune Färbung des Zellkerns. Die Proliferation von Hepatozyten wurde 6 und 48 h nach IR-Schaden untersucht. 6 h nach IR waren keine Unterschiede in der Proliferationsrate zwischen den Gruppen erkennbar. Nur ein geringer Anteil der Hepatozyten im Mittel 5% befand sich in der Inter- oder Teilungsphase. Des Weiteren zeigten Wildtypen und 1122-7- Tiere 48 h nach IR-Schaden ebenfalls nur eine niedrige Anzahl von positiv gefärbten Zellen. Nur etwa 10% der Hepatozyten exprimierten das Protein Ki-67 in beiden Gruppen. In den *Il22bp^{-/-}* Tieren wurde dagegen teilweise eine Proliferationsrate von über 30% festgestellt (Abb. 3.5).

Ergebnisse



Abbildung 3.5: (A) Repräsentative mikroskopische Aufnahme von Ki-67 gefärbten Leberzellen. Quantifizierung der Proliferationsrate von Hepatozyten 6 h nach IR-Schaden in Wildtypen, *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Tieren nach Auszählung mit Hilfe des Programms ImageJ. (B) Repräsentative mikroskopische Aufnahme von Ki-67 gefärbten Leberzellen. Quantifizierung der Hepatozytenproliferation 48 h nach Leberschädigung in Wildtypen, *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Tieren mittels ImageJ. Angaben +/- SEM; n = 8-13; * p = < 0.05.

Die DNA-Fragmentierung bei apoptotischen Zellen in paraffinierten Leberpräparaten kann mittels TUNEL-Methode (siehe 2.2.5.4) sichtbar gemacht werden. In dieser Methode sind die betroffenen Zellen mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die Auswertung zeigte in den Wildtypen und *Il22^{-/-}* eine vergleichsweise signifikant geringere Anzahl an positiv gefärbten Zellen im Gegensatz zu den *Il22bp^{-/-}* Tieren. 6 h nach Leberschädigung waren ca. 20% weniger Hepatozyten in den Wildtypen und *Il22^{-/-}* Tieren von Apoptose betroffen (Abb. 3.6).



Abbildung 3.6: Repräsentative mikroskopische Aufnahme von TUNEL-positiven Zellen 6 h nach IR-Schaden in Leberpräparaten von Wildtypen, *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Tieren. Quantifizierung der apoptotischen Zellen mit Hilfe des Programms ImageJ. Angaben +/- SEM; n = 8-9; * p = < 0,05; ** p = < 0,01.

Die erhöhte Proliferations- und Apoptoserate in Folge der Leberschädigung in den *Il22bp^{-/-}* Tieren unterstützt die bisherigen Ergebnisse. Die *Il22bp^{-/-}* Tiere wiesen 6 h nach IR einen großen Teil an nekrotischem Gewebe und somit absterbenden Hepatozyten auf. Nach 48 h war die Regeneration vermutlich auf Grund der übermäßigen und noch bestehenden Leberschädigung in den *Il22bp^{-/-}* Tieren noch nicht abgeschlossen. Daher konnten vermehrt proliferierende Hepatozyten nachgewiesen werden. Die Kontrollgruppe und die *Il22^{-/-}* Tiere zeigten nach der Behandlung sowohl in der Proliferation als auch in der Apoptoserate keinen Unterschied. Beide Versuchsgruppen entwickelten hinsichtlich der histologischen Untersuchungen einen deutlich geringeren Leberschaden nach IR. Währenddessen lässt die niedrige Proliferationsrate 6 h nach IR vermuten, dass die kompensatorische Regenerationsphase in allen drei Gruppen erst zu einem späteren Zeitpunkt stattfindet.

3.1.2 Acetaminophen(APAP)-induzierter Leberschaden

3.1.2.1 Regulation von Il22, Il22bp und Il22r1 während einer APAP-vermittelten Leberschädigung

In diesem Experiment wurden Wildtypen mit APAP behandelt und das Genexpressionsmuster von *Il22, Il22bp* und *Il22r1* in Leberproben nach 3, 8, 24 und 48 h mit Hilfe der RT-PCR untersucht. Als Kontrolle dienten unbehandelte Wildtypen. Das Gen *Il22* wurde bereits 3 h nach dem induzierten Leberschaden hochreguliert und die Expression konnte noch 24 h nach APAP-Injektion nachgewiesen werden. *Il22bp* zeigte keinen signifikanten Unterschied vor und nach APAP-induzierter Leberschädigung. Allerdings wurde im zeitlichen Verlauf nach Injektion die Expression von *Il22bp* tendenziell herunterreguliert. Das Genexpressionsmuster von *Il22r1* zeigte keine grundlegenden Veränderungen nach APAP-vermittelten Leberschaden (Abb. 3.7).



Abbildung 3.7: Genexpressionsanalyse von hepatischen *Il22*, *Il22bp* und *Il22r1* mittels RT-PCR von unbehandelten Wildtypen sowie 3, 8, 24 und 48 h nach APAP-vermitteltem Schaden. Angaben +/- SEM;

n = 4-10.

3.1.2.2 Einfluss von IL-22 und IL-22BP auf die hepatoxische Wirkung von Acetaminophen

Für diese Untersuchung wurde APAP in Wildtypen, *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Tieren injiziert und die ALT-Werte im Plasma nach 6, 24 und 48 h bestimmt. 6 h nach Injektion zeigten *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren einen signifikanten Anstieg der ALT-Werte. Des Weiteren konnte nach 24 h in allen drei Gruppen ein deutlich erhöhter ALT-Spiegel, allerdings ohne signifikanten Unterschied nachgewiesen werden. 48 h nach Injektion sank der ALT-Spiegel in allen drei Gruppen. Jedoch wurde in der Kontrollgruppe im Gegensatz zu den *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Tieren wesentlich niedrigere ALT-Werte gemessen (Abb. 3.8).



Abbildung 3.8: Nachweis der Alanin-Aminotransferase in Wildtypen, $Il22^{-/-}$ und $Il22bp^{-/-}$ Tieren 6, 24 und 48 h nach APAP-induzierten Schaden. Die Daten zeigen Ergebnisse aus mehreren unabhängigen Experimenten. Angaben +/- SEM; n = 14-35; * p = < 0,05; ** p = < 0,01 *** p = < 0,001.

In diesem Modell weisen sowohl die $Il22^{-/-}$ Tiere als auch die $Il22bp^{-/-}$ Tiere 6 h nach der Injektion und 48 h später in der Regenerationsphase im Vergleich zu den

Kontrolltieren deutlich signifikant erhöhte ALT-Werte auf. Gemessen am ALT-Spiegel ist die Leberschädigung 24 h nach APAP-Injektion in allen drei Gruppen am stärksten ausgeprägt. Zu diesem Zeitpunkt konnte jedoch kein Unterschied detektiert werden.

Die histologischen Untersuchungen der APAP-behandelten Tiere bestätigten die Ergebnisse der Transaminasenmessung. Die Leberpräparate wurden ebenfalls 6, 24 und 48 h nach Injektion angefertigt und mikroskopisch analysiert. Die Auswertung zeigte bereits 6 h nach Behandlung große Areale mit Nekrose in den Leberproben der *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Tieren im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Nach 24 h war hingegen kein Unterschied im Ausmaß der Nekrose zwischen den einzelnen Gruppen sichtbar. Im Gegensatz dazu konnte 48h nach Injektion nur wenig zerstörtes Gewebe in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Indessen zeigten die Leberpräparate der *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Tiere weiterhin Bereiche mit nekrotischen Läsionen (Abb. 3.9).



Ergebnisse



Abbildung 3.9: (**A**) Repräsentative mikroskopische Aufnahme von H&E gefärbten Leberpräparaten 6 h nach APAP-Schaden in Wildtypen, $II22^{-/-}$ und $II22bp^{-/-}$ Tieren. Quantifizierung der Nekroseläsionen mittels ImageJ; n = 6-7. (**B**) Repräsentative mikroskopische Aufnahme von H&E gefärbten Leberpräparaten 24 h nach APAP-induzierten Schaden in Wildtypen, $II22^{-/-}$ und $II22bp^{-/-}$ Tieren und Quantifizierung der Nekroseläsionen; n = 10-11. (**C**) Repräsentative mikroskopische Aufnahme von H&E gefärbten Leberpräparaten 48 h nach APAP-vermittelten Schaden in Wildtypen, $II22^{-/-}$ und $II22bp^{-/-}$ Tieren und Quantifizierung der Nekroseläsionen. Die Graphen zeigen Ergebnisse aus zwei unabhängigen

Experimenten. Angaben +/- SEM; n = 10-18; * p = < 0,05; ** p = < 0,01.

Im Unterschied zu dem IR-vermittelten Leberschaden konnte in diesem Modell nicht nur in den $II22bp^{-/-}$ Tieren, sondern auch in den $II22^{-/-}$ Tieren eine stärker ausgeprägte Leberschädigung im Vergleich zu den Kontrolltieren nachgewiesen werden. Wenige Stunden nach der Behandlung zeigten beide Gruppen erhöhte Transaminasen im Plasma und große nekrotische Areale in der Leber. Die Kontrollgruppe entwickelte erst 24 h nach Injektion einen ähnlichen Phänotyp. Die Leber der Wildtypen konnte sich allerdings innerhalb von 24 h fast vollständig regenerieren. Dementgegen war die Regenerationsphase in den $II22bp^{-/-}$ und $II22^{-/-}$ Tieren nach 48 h noch nicht abgeschlossen.

3.1.2.3 Nachweis der Proliferations- und Apoptoserate nach APAP-induzierten Leberschaden

Der Einfluss der Leberschädigung auf die Proliferation der Hepatozyten wurde mit Hilfe der Ki-67 Zellkernfärbung in den Leberpräparaten von Wildtypen, *Il22^{-/-}* und Il22bp^{-/-} Tieren 24 und 48 h nach APAP-Injektion untersucht. 24 h nach APAP-Behandlung wurde in allen drei Gruppen nur eine geringe Anzahl, weniger als 1%, an proliferierenden Zellen in den Leberproben gefunden. Im Gegensatz dazu waren 48 h nach APAP-Injektion durchschnittlich 18% der Hepatozyten der Wildtypen positiv für Ki-67 gefärbt und die Hepatozyten der *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Tiere wiesen eine Proliferationsrate von ca. 30% auf. In allen drei Gruppen zeigte sich eine relativ hohe proliferierenden Hepatozyten. Zahl Jedoch das Ausmaß an war der Hepatozytenproliferation in den Il22^{-/-} und Il22bp^{-/-} Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erhöht (Abb. 3.10).



24 h nach APAP



Abbildung 3.10: (**A**) Repräsentative mikroskopische Aufnahme von Ki-67 gefärbten Leberpräparaten 24 h nach APAP-Schaden in Wildtypen, *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Tieren und Quantifizierung von Ki-67 positiven Hepatozyten mit Hilfe des Programms ImageJ. (**B**) Repräsentative mikroskopische Aufnahme von Ki-67 gefärbten Leberpräparaten 48 h nach APAP-Schaden in Wildtypen, *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Tieren und Quantifizierung mit Hilfe des Programms ImageJ. Angaben +/- SEM; n = 5-13; * p = < 0,05; ** p = < 0,01.

Die Bestimmung der Anzahl von apoptotischen Hepatozyten wurde mit Hilfe der TUNEL-Zellkernfärbung 6 h nach APAP-Behandlung in den Lebergeweben von Wildtypen, *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Tieren durchgeführt. Im Durchschnitt waren 20-30% der Hepatozyten von den *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Tieren positiv gefärbt. Die Kontrollgruppe zeigte im Mittel hingegen nur ca.10% von Apoptose betroffene Zellen (Abb. 3.11).



Abbildung 3.11: Repräsentative mikroskopische Aufnahme von TUNEL gefärbten Leberpräparaten 6 h nach APAP-Schaden in Wildtypen, $ll22^{-/-}$ und $ll22bp^{-/-}$ Tieren und Quantifizierung nach Auszählen der Zellkerne mit Hilfe des Programms ImageJ. Angaben +/- SEM; n = 5.

Die geringe Proliferation der Hepatozyten 24 h nach Behandlung korreliert höchstwahrscheinlich mit dem erheblichen Schaden, der zu diesem Zeitpunkt gemessen werden konnte. Des Weiteren wurden 48 h nach Injektion eine vergleichsweise höhere Proliferationsrate in den nach wie vor teilweise zerstörten Lebergewebe der *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Tieren nachgewiesen, was eine verzögerte Regenerationsphase vermuten lässt. 6 h nach der APAP-Behandlung zeigten die *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Tiere einen wesentlich größeren Leberschaden. Die TUNEL-Färbung zeigte passend hierzu im Vergleich zu den Wildtypen einen größeren Anteil an apoptotischen Zellen in den Leberpräparaten der *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Tiere.

3.1.3 Partielle Hepatektomie (PHx)

3.1.3.1 Regulation von Il22, Il22bp und Il22r1 nach einer partiellen Hepatektomie

Ein weiteres akutes Leberschädigungsmodell stellt die partielle Hepatektomie dar, in der 2/3 des Lebergewebes operativ entfernt werden. In diesem Modell sind keine nekrotischen Läsionen durch beispielsweise toxische Einflüsse im Lebergewebe vorzufinden. Die zurückbleibenden Leberlappen wachsen auf das Ausgangsvolumen heran, sodass vor allem die Phase der Regeneration untersucht werden kann. Für die Überprüfung des Expressionsmusters von *Il22*, *Il22bp* und *Il22r1* wurden 3 und 6 Tage nach der Operation die Gene in den Leberproben von Wildtypen mit Hilfe der RT-PCR analysiert. Als Kontrolle dienten dabei unbehandelte Wildtypen. Die *Il22* RNA Expression konnte 3 Tage und zum Teil auch noch 6 Tage nach der PHx in den nachwachsenden Leberlappen nachgewiesen werden. Die unbehandelten Tiere zeigten wie auch in den anderen Modellen keine Expression von *Il22*. *Il22bp* und *Il22r1* wurden 5.12)



Abbildung 3.12: Genexpressionsanalyse von *Il22*, *Il22bp* und *Il22r1* mittels RT-PCR aus dem Lebergewebe von unbehandelten Wildtypen sowie 3 und 6 Tage nach PHx. Angaben +/- SEM; n = 3-4.

3.1.3.2 Ermittlung des Lebervolumens nach partieller Hepatektomie

Für das Leberregenerationsmodell wurden ca. zwei Drittel von der jeweiligen Leber operativ entfernt und die Regeneration mit Hilfe von MRT Aufnahmen dokumentiert.

Zu Beginn wurde das Orginalvolumen der Lebern von Wildtypen, *II22^{-/-}* und *II22bp^{-/-}* Tieren durch eine MRT Untersuchung ermittelt. Im Anschluss an die Hepatektomie konnte ein Verlust von durchschnittlich mehr als 60% des Lebergewebes in den Gruppen mittels MRT nachgewiesen werden. An den darauffolgenden Tagen regenerierte sich das Gewebe und erreichte nach 6-7 Tagen das Ausgangsvolumen. Zu keinem Messzeitpunkt gab es Hinweise auf eine beschleunigte oder verzögerte Regeneration der Lebern in den verschiedenen Gruppen. An Tag 6 nach der Operation zeigte die Auswertung des Lebergewebes der *II22bp^{-/-}* Tiere ein tendenziell größeres, aber nicht signifikant angestiegenes Volumen im Vergleich zu den Wildtypen und *II22^{-/-}* Tieren (Abb. 3.13).

Tag 0 vor der PHx



Tag 0 nach der PHx

Tag 2 nach der PHx

Tag 4 nach der PHx

Tag 6 nach der PHx





Abbildung 3.13: Repräsentative MRT-Aufnahmen des Regenerationsverlaufs der Leber vor und nach PHx an Tag 0, 2, 4 und 6. Auswertung des relativen Lebervolumen von Wildtypen, $II22^{-/-}$ und $II22bp^{-/-}$ Tieren 0, 2, 4 und 6 Tage nach PHx mittels MRT-Dokumentation und Quantifizierung des Lebervolumens nach Auswertung der Aufnahmen mit Hilfe des Programms ImageJ. Angaben +/- SEM; n = 7.

3.1.3.3 Histologische Überprüfung der Proliferationsrate und Morphologie nach partieller Hepatektomie

Die Untersuchung mit Hilfe der MRT-Aufnahmen zeigten keine Unterschiede in der Regeneration des Lebervolumens. Daher wurde auf histologischer Ebene die Proliferation der Hepatozyten an Tag 6 nach der PHx mit Hilfe einer Ki-67 Zellkernfärbung ausgewertet. Darüber hinaus erfolgte eine Überprüfung der Lebermorphologie nach vollständiger Regeneration der Lebern von Wildtypen, *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Tieren.

An Tag 6 nach der Hepatektomie wurde die Proliferationsrate in Leberpräparaten von Wildtypen, *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Tieren mikroskopisch erfasst und analysiert. Die *Il22bp^{-/-}* Tiere zeigten tendenziell eine höhere Anzahl an Ki-67 positiv gefärbten Hepatozyten. Allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant verschieden (Abb. 3.14).


Abbildung 3.14: Repräsentative mikroskopische Aufnahme von Ki-67 gefärbten Leberpräparaten 6 Tage nach PHx in Wildtypen, *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Tieren und Quantifizierung mit Hilfe des Programms ImageJ. Angaben +/- SEM; n = 5.

Die histologische Begutachtung nach der Regenerationsphase zeigte in allen drei Gruppen eine normale Morphologie des Leberparenchyms sowie keine Zellinfiltrate oder geschädigten Areale. Es konnten keine Veränderungen auf Grund der unterschiedlichen Genotypen nachgewiesen werden (Abb. 3.15).



Abbildung 3.15: Repräsentative mikroskopische Aufnahme von H&E gefärbten Leberpräparaten 6 Tage nach PHx in Wildtypen, *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Tieren.

Eine weitere Analyse der Hepatozytenproliferation ergab keinen Hinweis auf ein verändertes Regenerationspotential der *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Tiere verglichen mit der Kontrollgruppe. Eine leichte Tendenz zu einer gesteigerten Proliferation war in den *Il22bp^{-/-}* Tieren mittels Ki-67 Zellkernfärbung nach der PHx nachweisbar.

3.1.4 Charakterisierung der leukozytären Zellinfiltration während eines IRvermittelten Leberschadens

In den nachfolgenden mechanistischen Untersuchungen fokussierten wir uns auf das Ischämie-Reperfusion (IR-) Model. Um den Einfluss von unterschiedlichen Leukozytenpopulationen nach einem IR-induzierten Schaden im Lebergewebe von Wildtypen, *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Tieren zu untersuchen, wurde durchflusszytometrisch 12 h nach IR-Schaden die Infiltration von verschiedenen Immunzellpopulationen in die Leber bestimmt. Zuvor wurden sowohl tote Zellen als auch Dubletten ausgeschlossen und alle Zellen die den Leukozytenmarker CD45 auf ihrer Oberfläche trugen als Ausgangsbasis verwendet. Mit Hilfe der in Abb. 3.16 dargestellten Gating-Strategie erfolgte die Auftrennung von Granulozyten (Ly6G⁺, CD11b⁺), NK-Zellen (NK1.1⁺, CD3⁻), dendritische Zellen (sowohl CD11c⁺, CD11b⁻ als auch CD11c⁺, CD11b⁺) und Monozyten (Ly6C⁺, CD11b⁺). Allerdings wurde in der Auswertung nicht zwischen Leber-residenten und infiltrierenden Immunzellen unterschieden.



Abbildung 3.16: Repräsentative FACS-Blots als Gating-Strategie für Granulozyten (Ly6G⁺, CD11b⁺), NK-Zellen (NK1.1⁺, CD3⁻), dendritische Zellen (CD11c⁺, CD11b⁻; CD11c⁺, CD11b⁺) und Monozyten (Ly6C⁺, CD11b⁺).

Die durchflusszytometrische Analyse zeigte in der Infiltration von Granulozyten, NK-Zellen und dendritischen Zellen in den Lebern der Wildtypen, *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Tieren 12 h nach IR keinen signifikanten Unterschied. Dendritische Zellpopulationen waren im Lebergewebe der *Il22bp^{-/-}* Tieren tendenziell erhöht. Allerdings wurden signifikant mehr Ly6C⁺ CD11b⁺ Monozyten und CD11c⁺ CD11b⁺ dendritische Zellen in den Lebern der *Il22bp^{-/-}* Tiere im Vergleich zu den Wildtypen und *Il22^{-/-}* Tieren nach 12 h IR-Leberschädigung festgestellt (Abb. 3.17).



Abbildung 3.17: Quantifizierung der absoluten Zellzahl bezogen auf 1g Lebergewicht von Granulozyten (Ly6G⁺, CD11b⁺), NK-Zellen (NK1.1⁺, CD3⁻), dendritische Zellen (CD11c⁺, CD11b⁻; CD11c⁺, CD11b⁺)

und Monozyten (Ly6C⁺, CD11b⁺) in Wildtypen, $II22^{-/-}$ und $II22bp^{-/-}$ Tieren 12 h nach IR-vermittelten Leberschaden mit Hilfe des Programms FlowJo. Die Graphen zeigen Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten. Angaben +/- SEM; n =10-12; * p = < 0,05.

Darüber hinaus wurden in einem zweiten Versuchsansatz weitere Lymphozytenpopulationen wie $\gamma\delta$ T-Zellen ($\gamma\delta$ TCR⁺), CD4⁺ T-Helferzellen (CD3⁺, CD4⁺), T_H17 Zellen (IL-17A⁺, IFN- γ ⁻), T_H1 Zellen (IL-17A⁻, IFN- γ ⁺) und IFN- γ produzierende T_H17 Zellen (IL-17A⁺, IFN- γ ⁺) analysiert. Die Strategie für die durchflusszytometrische Auftrennung der Populationen ist in Abb. 3.18 dargestellt.



Abbildung 3.18: Repräsentative FACS-Blots als Gating-Strategie für $\gamma\delta$ T-Zellen ($\gamma\delta$ TCR⁺), CD4⁺ T-Helferzellen (CD3⁺, CD4⁺), T_H17 Zellen (IL-17A⁺, IFN- γ ⁻), T_H1 Zellen (IL-17A⁻, IFN- γ ⁺) und IFN- γ produzierende T_H17 Zellen (IL-17A⁺, IFN- γ ⁺).

Die Auswertung der einzelnen Populationen zeigte keine Unterschiede in der Zellinfiltration von $\gamma\delta$ T-Zellen, CD4⁺ T-Helferzellen, T_H17 Zellen und T_H1 Zellen in den Lebern der Wildtypen, *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Tieren 12 h nach IR-Schaden. Im Durchschnitt waren deutlich weniger T-Zellen in der Leber nachweisbar im Vergleich zu den Zellpopulationen des angeborenen Immunsystems. Da die Immunantwort des adaptiven Immunsystems etwas verzögert auftritt, könnte der früh gewählte Zeitpunkt nach der Leberschädigung ein Grund für die niedrigere Anzahl der T-Lymphozyten sein (Abb. 3.19).



Abbildung 3.19: Quantifizierung der absoluten Zellzahl bezogen auf 1g Lebergewicht von $\gamma\delta$ T-Zellen ($\gamma\delta$ TCR⁺), CD4⁺ T-Helferzellen (CD3⁺, CD4⁺), T_H17 Zellen (IL-17A⁺, IFN- γ ⁻), T_H1 Zellen (IL-17A⁻, IFN- γ ⁺) und IFN- γ produzierende T_H17 Zellen (IL-17A⁺, IFN- γ ⁺) in Wildtypen, *Il22^{-/-}* und *Il22bp*^{-/-} Tieren 12 h nach IR-vermittelten Leberschaden. Die Graphen zeigen Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten. Angaben +/- SEM; n =10-12.

Die Analyse der Zellinfiltration ergab eine verstärkte Rekrutierung von Ly6C⁺ CD11b⁺ Monozyten und CD11c⁺ CD11b⁺ dendritische Zellen in die Leber der *Il22bp^{-/-}* Tiere verglichen mit den Wildtypen und *Il22^{-/-}* Tieren 12 h nach IR-vermittelter 66 Leberschädigung. Andere Immunzellpopulationen zeigten in ihrer Anzahl hinsichtlich der verschiedenen Genotypen keine Auffälligkeiten nach Induktion des Leberschadens.

3.1.5 Untersuchung der zellulären Quelle von Il22 und Il22bp nach einem IR-vermittelten Schaden

Für die Überprüfung der zellulären Quelle von IL-22 und IL-22BP wurden verschiedene Immunzellpopulationen aus der Leber von Wildtypen mit Hilfe des fluoreszenzaktivierten Zellsortierers isoliert. Hierbei wurden Wildtypen verwendet, in denen 12 h zuvor ein IR-vermittelter Leberschaden induziert worden war. Die Kontrollgruppe bestand aus unbehandelten Tieren. Anschließend wurde die RNA aus den verschiedenen Zellpopulationen extrahiert und auf die Genexpression von *Il22* und *Il22bp* mittels RT-PCR untersucht (Abb. 3.20).



Abbildung 3.20: Genexpression von *Il22* und *Il22bp* in CD4⁺ T-Helferzellen (CD3⁺, CD4⁺), CD8⁺ T-67

Zellen (CD3⁺, CD8⁺), Monozyten (Ly6C⁺, CD11b⁺), Granulozyten (Ly6G⁺, CD11b⁺), dendritische Zellen (CD11c⁺, MHCII⁺). Die Zellen wurden zuvor aus Lebern von unbehandelten und IR-geschädigten Wildtypen isoliert. Die Daten zeigen Ergebnisse aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Angaben +/- SEM; n =5-6.

Il22 wurde im gesunden Lebergewebe und nach der Leberschädigung größtenteils von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen exprimiert. Nach dem IR-induzierten Schaden wurde die *Il22*-Expression von Monozyten (Ly6C⁺, CD11b⁺) und Granulozyten (Ly6G⁺, CD11b⁺) hochreguliert. Dendritische Zellen (CD11c⁺, MHCII⁺) wiesen ohne Leberschädigung eine geringe Expression auf, jedoch wurde das Gen nach dem IR-induzierten Schaden vollständig runterreguliert.

Il22bp wurde im gesunden Zustand aber auch nach einer Leberschädigung am stärksten von Granulozyten (Ly6G⁺, CD11b⁺) exprimiert. Vor allem aber CD4⁺ T-Zellen regulierten das Gen 12 h nach dem IR-Schaden im Gegensatz zu den anderen Populationen stark hoch. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Zellpopulationen im Vergleich zum gesunden Lebergewebe eine tendenziell höhere *Il22bp*-Expression nach der Leberschädigung aufwiesen.

Mit Hilfe von IL-22-sgBFP-Reportermäusen konnte ebenso die IL-22 Expression in Monozyten (Ly6C⁺, CD11b⁺), Granulozyten (Ly6G⁺, CD11b⁺) und CD4⁺-T Lymphozyten nach IR-vermittelten Schaden nachgewiesen werden. Für diesen Versuch wurden behandelte Wildtypen, die keine BFP Expression besitzen, als Kontrolle verwendet. (Abb. 3.21).



Abbildung 3.21: Repräsentative FACS Blots einer durchflusszytometrischen Analyse der IL-22-sgBFP-Expression von Leukozyten (CD45⁺), Monozyten (Ly6C⁺, CD11b⁺), Granulozyten (Ly6G⁺, CD11b⁺) und CD4⁺-T Lymphozyten. Die Zellisolation aus der Leber erfolgte 12 h nach IR von Wildtypen und IL-22sgBFP Reporter-Tieren.

3.1.6 Untersuchung des Mechanismus der verstärkten Leberschädigung in Il22bp^{-/-} Tieren nach einem IR-induzierten Schaden

3.1.6.1 RNA-Sequenzierung

Für die Untersuchung des Mechanismus wurde eine RNA-Sequenzierung durchgeführt. Hierbei wurden sowohl Proben von unbehandelten Lebern als auch von IRgeschädigtem Lebergewebe von Wildtypen, *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Tieren verwendet. Anhand der Datenanalyse konnte gezeigt werden, dass nur 12 Gene im Lebergewebe der behandelten *Il22^{-/-}* Tiere im Vergleich zu den Wildtypen unterschiedlich reguliert worden sind. Dieses Ergebnis unterstützt die Beobachtung, dass beide Gruppen einen ähnlichen Phänotyp nach IR-vermittelten Schaden aufwiesen. Im Gegensatz dazu zeigten die Proben der behandelten Wildtypen und *Il22bp^{-/-}* Tiere 1308 Gene, die unterschiedlich reguliert worden sind. Da die *Il22bp^{-/-}* Tiere einen deutlich höheren Schaden in der Leber nach IR entwickelten, wurden nach einer erneuten Analyse die Gene entfernt, deren Expression infolge der Leberschädigung beeinflusst worden waren. Dazu gehörten die Gene, die im Gegensatz zu den unbehandelten Wildtypen in den IR-behandelten Wildtypen hochreguliert waren. Daraufhin konnten 684 Gene identifiziert werden, die unabhängig vom Leberschaden und höchstwahrscheinlich auf Grund der Deletion von *Il22bp* eine veränderte Expression aufwiesen (Abb. 3.22).



Abbildung 3.22: (A) Streudiagramm der veränderten Genexpression im Lebergewebe von Wildtypen 70

und *II22^{-/-}* Tieren 12 h nach IR-induzierten Schaden. (**B**) Streudiagramm der veränderten Genexpression im Lebergewebe von Wildtypen und *II22bp^{-/-}* Tieren 12 h nach IR-vermitteltem Schaden. Die farbigen Punkte markieren Gene, die mindestens zweifach höher oder niedriger exprimiert worden sind und in ihrer Signifikanz einen p-Wert von <0,05 aufweisen. Rote Punkte weisen auf Gene, die abhängig vom Leberschaden reguliert worden sind und blaue Punkte markieren Gene, die unabhängig von der Leberschädigung ihre Expression verändert haben. Für die Untersuchung wurden Triplikate der RNA-Proben verwendet.

Des Weiteren konzentrierten wir uns auf spezifische Gene, die für eine verstärkte Infiltration und Rekrutierung von Ly6C⁺ CD11b⁺ Zellen in die Leber von *Il22bp^{-/-}* Tieren verantwortlich sein könnten. Dementsprechend wurden Veränderungen in der Chemokinexpression untersucht und verschiedene Expressionsmuster in den Lebern der *Il22bp^{-/-}* Tiere im Vergleich zu den Wildtypen festgestellt (Abb. 3.23).



Abbildung 3.23: Veränderung der Chemokinexpression nach 12 h IR-induzierten Leberschaden in Wildtypen und *Il22bp^{-/-}* Tieren. y-Achse: Vergleich der Expressionsänderung von behandelten Wildtypen gegen unbehandelte Wildtypen, x-Achse: Expressionsänderung von behandelten *Il22bp^{-/-}* Tieren im Vergleich zu behandelten Wildtypen. Rote Punkte weisen auf Gene, die nach dem Leberschaden ungeachtet vom Genotyp reguliert worden sind. Blaue Punkte markieren Gene, die ihre Expression unabhängig vom Leberschaden in den behandelten *Il22bp^{-/-}* Tieren im Gegensatz zu den behandelten Wildtypen hochreguliert haben.

Für eine Bestätigung der Ergebnisse wurde die Chemokinexpression im Lebergewebe mittels RT-PCR in behandelten sowie unbehandelten Wildtypen und *Il22bp^{-/-}* Tieren



überprüft. In der Abbildung 3.24 ist die Genexpression von *Ccl2*, *Ccl5*, *Ccl7*, *Cxcl1*, *Cxcl4*, *Cxcl5*, *Cxcl7*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Cxcl12* und *Cxcl13* dargestellt.

Abbildung 3.24: Überprüfung der Genexpression *Ccl2*, *Ccl5*, *Ccl7*, *Cxcl1*, *Cxcl4*, *Cxcl5*, *Cxcl7*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Cxcl12* und *Cxcl13* mittels RT-PCR in Lebergewebe von unbehandelten Wildtypen und *Il22bp^{-/-}* Tieren, sowie Leberproben von behandelten Wildtypen und *Il22bp^{-/-}* Tieren 12 h nach IR-Schaden. Angaben +/- SEM; n = 6; * p = < 0,05; ** p = < 0,01; *** p = < 0,001.

Die Untersuchung der Genexpression ergab eine Hochregulation des Gens *Ccl2*, *Ccl7*, *Cxcl4*, *Cxcl7 und Cxcl10* in den Leberproben der IR-behandelten *Il22bp^{-/-}* Tiere im Vergleich zu den unbehandelten Proben und den IR-behandelten Wildtypen. Jedoch

hatte die RNA-Sequenzierung gezeigt, dass die Hochregulation der Gene *Ccl2* und *Ccl7* im Lebergewebe der IR-behandelten *Il22bp^{-/-}* Tiere im Vergleich zu den IR-behandelten Wildtypen höchstwahrscheinlich abhängig vom verstärkten Leberschaden war und nicht auf einen direkten Effekt von *Il22bp* zurückzuführen ist. Die Gene *Ccl5*, *Cxcl1* und *Cxcl5* wurden ebenso nach Behandlung hochreguliert. Dennoch konnte kein Unterschied zwischen den IR-behandelten *Il22bp^{-/-}* Tieren und IR-behandelten Wildtypen nachgewiesen werden. *Cxcl12* war dagegen in den IR-behandelten *Il22bp^{-/-}* Tieren herunterreguliert im Vergleich zu den IR-behandelten Wildtypen. *Cxcl11* und *Cxcl13* zeigten keine Veränderung in der Genexpression in beiden Gruppen nach der Behandlung.

3.1.6.2 Überprüfung eines CXCL10 abhängigen Mechanismus der verstärkten Leberschädigung in den Il22bp^{-/-} Tieren

Das Chemokin CXCL10 wurde bereits im Kontext des IR-induzierten Schadens als proinflammatorischer Faktor beschrieben. Die Untersuchung zeigte, dass *Cxcl10^{-/-}* Tiere während einer IR-vermittelten Leberschädigung geschützt waren¹⁷⁹. Auf Grund der Hochregulation von *Cxcl10* in den *Il22bp^{-/-}* Tieren wurde ein CXCL10 abhängiger Mechanismus überprüft. Dafür wurden Wildtypen und *Il22bp^{-/-}* Tiere mit einem Antikörper gegen CXCL10 behandelt und 24 h später eine IR-Schädigung durchgeführt. Als Kontrolle dienten Wildtypen und *Il22bp^{-/-}* Tiere, die nicht mit dem Antikörper behandelt worden waren.

(A)



6 h nach IR

48 h nach IR



Abbildung 3.25: (**A**) Nachweis der Alanin-Aminotransferase in Wildtypen und $Il22bp^{-/-}$ Tieren, die 24 h zuvor mit einem anti-CXCL10 Antikörper behandelt worden sind und Wildtypen und $Il22bp^{-/-}$ Tieren ohne Antikörperbehandlung 6 und 48 h nach IR-Schaden. (**B**) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von H&E gefärbten Leberpräparaten von Wildtypen und $Il22bp^{-/-}$ Tieren mit und ohne Antikörperbehandlung 48 h nach IR-Schaden. Quantifizierung der Nekroseläsionen mit Hilfe des Programms ImageJ. Die Ergebnisse zeigen Daten von drei unabhängigen Experimenten. Angaben +/- SEM; n = 3-16; * p = < 0,05; ** p = < 0,01.

Für die Auswertung der Leberschädigung wurden die Transaminasen 6 und 48 h nach IR im Plasma gemessen. Die Antikörper-behandelten *Il22bp^{-/-}* Tiere aber nicht die Wildtypen wiesen in beiden Untersuchungen signifikant geringere ALT-Werte im Vergleich zu den unbehandelten Tieren auf. Die Untersuchung der Nekrose im Lebergewebe zeigte ebenso deutliche Unterschiede zwischen den vorbehandelten und nicht behandelten *Il22bp^{-/-}* Tieren aber nicht in den Wildtypen. In den Leberproben der *Il22bp^{-/-}* Tiere, die zuvor mit dem anti-CXCL10 Antikörper behandelt worden waren,

konnten weniger Nekroseläsionen beobachtet werden. Darüber hinaus zeigten die unbehandelten *Il22bp^{-/-}* Tiere im Vergleich zu den unbehandelten Wildtypen in der Histologie und anhand der Transaminasen einen höheren Leberschaden, während anti-CXCL10 behandelte *Il22bp^{-/-}* Tiere und Wildtypen in der Histologie und anhand der Transaminasen einen vergleichbaren Leberschaden hatten. Folglich deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die erhöhte Suszeptibilität der IL-22BP defizienten Tiere zumindest teilweise abhängig von CXCL10 zu sein scheint (Abb. 3.25).

3.1.7 Untersuchung der Expression von Cxcl10 und Cyp2e1 im APAPinduzierten Leberschaden

In einem zweiten Schritt sollte überprüft werden, ob ähnliche Mechanismen im APAPinduzierten Leberschaden vorliegen. Auf Grund eines Cxcl10-abhängigen Mechanismus einer verstärkten Leberschädigung im IR-Modell wurde die *Cxcl10* Expression ebenso auch in den APAP behandelten Wildtypen und *IL22bp^{-/-}* Tieren überprüft. Die Injektion mit APAP verursachte eine gesteigerte Expression von *Cxcl10* in beiden Versuchsgruppen. Nach 24 h wurde das Gen erheblich runterreguliert. 48 h nach APAP-Injektion hatte sich die Expression noch nicht wieder normalisiert. Wildtypen und *IL22bp^{-/-}* Tiere zeigten beide das gleiche Expressionsmuster und wiesen keine signifikanten Unterschiede in der *Cxcl10* Expression zu den überprüften Zeitpunkten nach APAP-Injektion auf (Abb.3.26).



Abbildung 3.26: Überprüfung der Genexpression von *Cxcl10* mittels RT-PCR in Lebergewebe von unbehandelten Wildtypen und $Il22bp^{-/-}$ Tieren, sowie Leberproben von behandelten Wildtypen und $Il22bp^{-/-}$ Tieren 8, 24 und 48 h nach APAP-Injektion. Angaben +/- SEM; n = 4-10.

Eine Untersuchung zeigte, dass transgene Tiere mit einer Überexpression von IL-22 in der Leber eine verstärkte Leberschädigung nach APAP-Injektion aufweisen. In diesem Zusammenhang konnte ein Cytochrom 2E1 abhängiger Mechanismus festgestellt werden. Die transgenen Tiere zeigten per se eine gesteigerte Expression des Cytochroms. Eine Deletion von Cyp2E1 verminderte die Leberschädigung¹⁶⁹. Infolgedessen wurde die Expression von Cyp2e1 in Wildtypen und $IL22bp^{-/-}$ Tieren überprüft (Abb. 3.27).



Abbildung 3.27: Überprüfung der Genexpression von *Cyp2e1* mittels RT-PCR in Lebergewebe von unbehandelten Wildtypen und $Il22bp^{-/-}$ Tieren, sowie Leberproben von behandelten Wildtypen und $Il22bp^{-/-}$ Tieren 8, 24 und 48 h nach APAP-Injektion. Angaben +/- SEM; n = 4-10.

Im gesunden Zustand war die Expression des Cytochroms *Cyp2e1* in den Wildtypen und *IL22bp^{-/-}* Tieren ähnlich stark ausgeprägt. Beide Versuchsgruppen zeigten 8 h nach APAP-Behandlung eine deutlich geringere Expression, die sich jedoch nach 48 h wieder normalisierte. Wildtypen und *IL22bp^{-/-}* Tieren zeigten allerdings zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede in der Expressionsstärke von *Cyp2e1* nach der APAP-Injektion.

Die Untersuchung der *Cxcl10* und *Cyp2e1* Expression nach einem APAP-vermittelten Leberschaden ergab keinen Hinweis auf eine veränderte Genregulation hinsichtlich der verschiedenen Genotypen.

3.1.8 Überprüfung der Leukozytenzusammensetzung nach einem APAPinduzierten Leberschaden in Wildtypen, Il22^{-/-} und Il22bp^{-/-} Tieren

Für die Untersuchung der Rolle von IL-22 in der verstärkten Leberschädigung erfolgte eine Charakterisierung der infiltrierenden Immunzellen nach einer APAP-Behandlung. Dafür wurde eine Auftrennung der Leukozyten, wie in Abbildung 3.16 und 3.18 dargestellt, durchgeführt. Für den ersten Versuchsansatz wurde die absolute Zellzahl von Granulozyten (Ly6G⁺, CD11b⁺), NK-Zellen (NK1.1⁺, CD3⁻), dendritische Zellen (CD11c⁺, CD11b⁻; CD11c⁺, CD11b⁺) und Monozyten (Ly6C⁺, CD11b⁺) 6 und 24 h nach APAP-Injektion in den Lebern von Wildtypen, *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Tieren überprüft (Abb. 3.28 A und B).

(A)







(B)

24 h nach APAP-Injektion





Abbildung 3.28: Quantifizierung der absoluten Zellzahl bezogen auf 1g Lebergewicht von Granulozyten (Ly6G⁺, CD11b⁺), NK-Zellen (NK1.1⁺, CD3⁻), dendritische Zellen (CD11c⁺, CD11b⁻; CD11c⁺, CD11b⁺) und Monozyten (Ly6C⁺, CD11b⁺) in Wildtypen, *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Tieren 6 h (**A**) und 24 h (**B**) nach APAP-vermittelten Leberschaden mit Hilfe des Programms FlowJo. Angaben +/- SEM; n = 6.

Die durchflusszytometrische Auswertung zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl von Granulozyten, NK-Zellen, dendritischen Zellen und Monozyten in den Lebern der Wildtypen, $II22^{-/-}$ und $II22bp^{-/-}$ Tieren 6 und 24 h nach APAP-induzierter Leberschädigung. Allerdings konnten tendenziell weniger NK-Zellen und dendritische Zellen (CD11c⁺, CD11b⁺) 24 h nach APAP-Injektion in den $II22bp^{-/-}$ Tieren im Vergleich zu den Wildtypen festgestellt werden. Für eine Bestätigung der verminderten Zellzahl von NK-Zellen und dendritischen Zellen müsste jedoch ein zweiter Versuch durchgeführt werden. Für den nächsten Versuchsansatz erfolgte eine Analyse der Infiltration von $\gamma\delta$ T-Zellen ($\gamma\delta$ TCR⁺) und CD4⁺ T-Helferzellen (CD3⁺, CD4⁺) 6 h nach APAP-Injektion in Wildtypen, $II22^{-/-}$ und $II22bp^{-/-}$ Tieren (Abb. 3.29 A). Darüber hinaus wurden 24 h nach Behandlung zusätzlich die T-Helferpopulationen T_H17 Zellen (IL-17A⁺, IFN- γ^{-}), T_H1 Zellen (IL-17A⁻, IFN- γ^{+}) und IFN- γ produzierende T_H17 Zellen (IL-17A⁺, IFN- γ^{+}) in den Lebern der Wildtypen, $II22^{-/-}$ und $II22bp^{-/-}$ Tiere untersucht (Abb. 3.29 B).



80



Abbildung 3.29: (**A**) Quantifizierung der absoluten Zellzahl bezogen auf 1g Lebergewicht von γδ T-Zellen (γδ TCR⁺) und CD4⁺ T-Helferzellen (CD3⁺, CD4⁺) in Wildtypen, *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Tieren 6 h nach APAP-vermittelten Leberschaden. (**B**) Quantifizierung der absoluten Zellzahl bezogen auf 1g Lebergewicht von γδ T-Zellen (γδ TCR⁺), CD4⁺ T-Helferzellen (CD3⁺, CD4⁺) T_H17 Zellen (IL-17A⁺, IFN-γ⁻), T_H1 Zellen (IL-17A⁻, IFN-γ⁺) und IFN-γ produzierende T_H17 Zellen (IL-17A⁺, IFN-γ⁺) in Wildtypen, *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Tieren 24 h nach APAP-Injektion. Angaben +/- SEM; n = 6.

Es konnten keine Unterschiede in der Zellinfiltration von $\gamma\delta$ T-Zellen und CD4⁺ T-Helferzellen 6 h nach APAP-Injektion festgestellt werden. Darüber hinaus zeigte die Auswertung 24 h nach APAP-Behandlung ebenso keine signifikanten Abweichungen in der Anzahl der $\gamma\delta$ T-Zellen, CD4⁺ T-Zellen, T_H17 Zellen und T_H1 Zellen in den Lebern der Wildtypen, *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Tieren. Die Analyse der Zellinfiltration ergab in Bezug auf die verschiedenen Genotypen keine signifikanten Auffälligkeiten nach Induktion des Leberschadens.

3.1.9 Aktivierung von STAT3 im APAP-vermittelten Schaden im Lebergewebe von Wildtypen, Il22^{-/-} und Il22bp^{-/-} Tieren

In der Literatur wurde bereits gezeigt, dass die Vorbehandlung mit rekombinanten IL-22 Protein sich protektiv auf den APAP-induzierten Leberschaden auswirkt. Dieser Mechanismus ist von der STAT3-Aktivierung abhängig, da eine Leber-spezifische STAT3 Deletion den hepatoprotektiven Einfluss von IL-22 im APAP-induzierten Leberschaden vollständig aufhebt¹⁶⁹. Des Weiteren ist bekannt, dass IL-22 STAT3 in Hepatozyten aktivieren kann¹⁴⁰. Ein verstärkter Leberschaden konnte auch in den *II22^{-/-}* und *II22bp^{-/-}* Tieren im Vergleich zu den Wildtypen nachgewiesen werden (Abb. 3.8 und 3.9). Infolgedessen wurde die STAT3-Aktivierung auf Proteinebene mittels Western Blot in Wildtypen, $Il22^{-/-}$ und $IL22bp^{-/-}$ Tieren 8 h nach einer APAP-Behandlung untersucht (Abb. 3.30).



Abbildung 3.30: Nachweis der STAT3-Phosphorylierung mit Hilfe des Western Blot-Verfahrens im Lebergewebe von unbehandelten Wildtypen, *Il22^{-/-}* und *IL22bp^{-/-}* Tieren und Leberproben von Wildtypen, *Il22^{-/-}* und *IL22bp^{-/-}* Tieren, die 8 h zuvor mit APAP behandelt worden sind. Der Nachweis von STAT3 diente als Ladekontrolle.

Die unbehandelten Proben weisen per se eine deutlich niedrigere Phosphorylierung von STAT3 auf verglichen mit APAP behandelten Tieren. Jedoch wurde der Transkriptionsfaktor bereits in den unbehandelten *Il22^{-/-}* Tieren verglichen mit Wildtypen nur sehr schwach aktiviert. Die Analyse zeigte eine starke Phosphorylierung von STAT3 8 h nach APAP-Injektion in den Wildtypen und zum Teil noch stärker in den *IL22bp^{-/-}* Tieren im Vergleich zu den unbehandelten Proben. Im Gegensatz dazu wurde STAT3 in den Leberproben der *Il22^{-/-}* Tiere nach APAP-Behandlung nur mäßig aktiviert. Das Ausmaß der Phosphorylierung war vergleichbar mit den Proben der unbehandelten *IL22bp^{-/-}* Tiere. Die Aktivierung von STAT3, die durch die APAP-Injektion hervorgerufen wird, scheint somit teilweise durch IL-22 bedingt zu sein.

3.2 Einfluss von IL-22 und IL-22BP im *Mdr2^{-/-}* Modell

Verschiedene Studien haben bereits gezeigt, dass IL-22 die Tumorentwicklung in der Leber durch die Aktivierung von STAT3 begünstigt^{140,147}. Ebenso ist auch ein wichtiger Effekt von IL-22BP in einem Kolitis-assoziierten Kolonkarzinommodell bekannt¹³⁶. Bisher wurden chemisch-induzierte Karzinommodelle verwendet um den Einfluss von IL-22 in der Hepatokarzinogenese zu untersuchen. Im Gegensatz dazu entwickeln *Mdr2^{-/-}* Tiere eine chronische Hepatitis mit fibrotischen und zirrhotischen Veränderungen, die anschließend zur Tumorentstehung führen kann¹⁷⁷. Weibliche Tiere weisen im Gegensatz zu den männlichen Tieren eine schwerwiegendere Pathologie in diesem Modell auf¹⁸⁰. Daher wurde für die Untersuchung der Funktion von IL-22 und IL-22BP in der Hepatokarzinogenese mit weiblichen Tieren gearbeitet.

3.2.1 Regulation der Genexpression von Il22, Il22bp und Il22r1 im Mdr2^{-/-} Modell

Für diesen Versuch wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Lebergewebeproben von weiblichen *Mdr2^{-/-}* Tieren entnommen, die RNA extrahiert und mittels RT-PCR die Expression von *Il22*, *Il22bp* und *Il22r1* untersucht. *Il22* konnte nur teilweise und mit geringer Expression in den Leberproben nachgewiesen werden. Die Analyse von *Il22bp* zeigte im Verlauf von 16 Monaten Schwankungen im Expressionsmuster. Nach 12 und 32 Wochen wurde das Gen leicht herunterreguliert. In der Genexpression von *Il22r1* konnte im zeitlichen Verlauf keine Veränderungen festgestellt werden (Abb. 3.31).



Abbildung 3.31: Genexpressionsanalyse von hepatischen *Il22*, *Il22bp* und *Il22r1* mittels RT-PCR von $Mdr2^{-/-}$ Tieren im Alter von 6, 12, 20, 32, 52 und 68 Wochen. Angaben +/- SEM; n = 3-6.

3.2.2 Untersuchung der Tumorentwicklung in Mdr2^{-/-}, Il22^{-/-}/Mdr2^{-/-} und Il22bp^{-/-}/Mdr2^{-/-} Tieren

Die Auswertung der Tumorentwicklung in den $Mdr2^{-/-}$, $Il22^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ und $Il22bp^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ Tieren erfolgte nach 52, 60 und 68 Wochen mit Hilfe von MRT-Untersuchungen. Die Ergebnisse zeigten keinen signifikanten Unterschied im gesamten Tumorvolumen zwischen den einzelnen Gruppen. Die $Il22^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ Tiere wiesen jedoch tendenziell kleinere Tumore auf im Vergleich zu den $Mdr2^{-/-}$ Tieren. Allerdings konnte auch kein Unterschied in der Anzahl der Läsionen festgestellt werden (Abb. 3.32).

(A)









Abbildung 3.32: (**A**) Repräsentative MRT-Aufnahmen von Tumoren in der Leber von $Mdr2^{-/-}$, $Il22^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ und $Il22bp^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ Tieren nach 68 Wochen. (**B**) Analyse des Tumorvolumens von $Mdr2^{-/-}$, $Il22^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ und $Il22bp^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ Tieren im Alter von 52, 60 und 68 Wochen mittels MRT-Dokumentation und Quantifizierung des Lebervolumens nach Auswertung der Aufnahmen mit Hilfe des Programms ImageJ. (**C**) Anzahl der Tumorläsionen in $Mdr2^{-/-}$, $Il22^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ und $Il22bp^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ Tieren nach 68 Wochen. Angaben +/- SEM; n = 13-17.

3.2.3 Untersuchung der Funktion von IL-22 und IL-22BP in der Leberschädigung der Mdr2^{-/-} Tiere im zeitlichen Verlauf

Mdr2^{-/-} Tiere entwickeln im frühen Alter eine cholestatische chronische Hepatitis mit fibrotischen Veränderungen des Lebergewebes. Mit Hilfe der Bestimmung von Transaminasen wurde das Ausmaß der Leberschädigung im zeitlichen Verlauf beobachtet. Die erste Blutabnahme erfolgte nach 6 Wochen. Weitere Messungen wurden bis zum Alter von 68 Wochen durchgeführt. *Il22bp^{-/-}/Mdr2^{-/-}* Tiere wiesen im frühen Alter tendenziell höhere ALT-Werte auf. Teilweise zeigten die *Il22^{-/-}/Mdr2^{-/-}* Tiere im Vergleich zu den *Mdr2^{-/-}* Tieren einen niedrigeren ALT-Spiegel. Jedoch fehlen histologische Befunde, um den Grad der Fibrose und Entzündung näher bestimmen zu können. Bis zum Ende der Messung blieben die Werte größtenteils unverändert. Nach 68 Wochen war kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen messbar (Abb. 3.33).



Abbildung 3.33: (A) Nachweis der Alanin-Aminotransferase in $Mdr2^{-/-}$, $Il22^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ und $Il22bp^{-/-}/Mdr2^{-/-}$. $/Mdr2^{-/-}$ Tieren an den angegebenen Zeitpunkten. (B) Nachweis der Alanin-Aminotransferase in $Mdr2^{-/-}$, $Il22^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ und $Il22bp^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ Tieren nach 68 Wochen. Angaben +/- SEM; n = 14-17.

3.2.4 Einfluss von IL-22 und IL-22BP auf die Proliferation während der Tumorentwicklung in den Mdr2^{-/-} Tieren

Für die Untersuchung der Proliferationsrate wurden Leberpräparate von 68 Wochen alten $Mdr2^{-/-}$, $Il22^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ und $Il22bp^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ Tieren angefertigt und immunhistochemisch auf die Expression von Ki-67 überprüft. Zwischen den Gruppen konnte in der Anzahl der proliferierenden Hepatozyten kein signifikanter Unterschied beobachtet werden. In der Tendenz zeigten $Il22bp^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ Tiere im Vergleich zu den $Mdr2^{-/-}$ und $Il22^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ Tieren mehr Ki-67 positive Hepatozyten (Abb. 3.34).



Abbildung 3.34: Repräsentative mikroskopische Aufnahme von Ki-67 gefärbten Leberpräparaten von $Mdr2^{-/-}$, $Il22^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ und $Il22bp^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ Tieren im Alter von 68 Wochen und Quantifizierung von Ki-67 positiven Hepatozyten mit Hilfe des Programms ImageJ. Angaben +/- SEM; n = 10.

3.2.5 Leukozytenzusammensetzung während der Tumorentwicklung in den Mdr2^{-/-}, Il22^{-/-}/Mdr2^{-/-} und Il22bp^{-/-}/Mdr2^{-/-} Tieren

Nach der Aufbereitung der Leberproben im Lebergewebe von 68 Wochen alten $Mdr2^{-/-}$, $Il22^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ und $Il22bp^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ Tieren erfolgte durchflusszytometrisch die Untersuchung der Zusammensetzung der einzelnen Leukozytenpopulationen. Mit Hilfe der in Abb. 3.16 dargestellten Gating-Strategie erfolgte die Auftrennung von Granulozyten (Ly6G⁺, CD11b⁺), NK-Zellen (NK1.1⁺, CD3⁻), dendritische Zellen (sowohl CD11c⁺, CD11b⁻ als auch CD11c⁺, CD11b⁺) und Monozyten (Ly6C⁺, CD11b⁺). Es wurde bei der Zellisolation der Leberproben nicht zwischen tumorösen und tumorfreiem Gewebe unterschieden. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte eine signifikant höhere Anzahl von Granulozyten in den Lebern der $Mdr2^{-/-}$ Tiere im Vergleich zu den $Il22^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ und $Il22bp^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ Tieren. Darüber hinaus war die Anzahl der dendritischen Zellen (CD11c⁺, CD11b⁻) und Monozyten im Lebergewebe ebenso signifikant niedriger in den $Il22bp^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ Tieren im Gegensatz zu den $Mdr2^{-/-}$ Tieren. Es konnten keine Unterschiede in der Anzahl der NK-Zellen und CD11c⁺



CD11b⁺ Zellen festgestellt werden (Abb. 3.35).

Abbildung 3.35: Quantifizierung der absoluten Zellzahl bezogen auf 1g Lebergewicht von Granulozyten (Ly6G⁺, CD11b⁺), NK-Zellen (NK1.1⁺, CD3⁻), dendritische Zellen (CD11c⁺, CD11b⁻; CD11c⁺, CD11b⁺) und Monozyten (Ly6C⁺, CD11b⁺) im Lebergewebe von $Mdr2^{-/-}$, $Il22^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ und $Il22bp^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ Tieren im Alter von 68 Wochen mit Hilfe des Programms FlowJo. Angaben +/- SEM; n = 6-11; * p = < 0,05.

Des Weiteren wurde die Zusammensetzung von Lymphozytenpopulationen wie $\gamma\delta$ T-Zellen ($\gamma\delta$ TCR⁺), CD4⁺ T-Helferzellen (CD3⁺, CD4⁺), T_H17 Zellen (IL-17A⁺, IFN- γ ⁻),

T_H1 Zellen (IL-17A⁻, IFN-γ⁺) und IFN-γ produzierende T_H17 Zellen (IL-17A⁺, IFN-γ⁺) analysiert. Die Strategie für die durchflusszytometrische Auftrennung der Populationen ist in Abb. 3.18 dargestellt. Die Analyse zeigte vermehrt IFN-γ⁺ T-Zellen insbesondere T_H17 Zellen in der Leber von *Il22^{-/-}/Mdr2^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}/Mdr2^{-/-}* Tieren im Vergleich zu den *Mdr2^{-/-}* Tieren. Weiterhin konnten auch tendenziell mehr γδ-T-Zellen in den *Mdr2^{-/-}* Tieren nachgewiesen werden (Abb. 3.36).



Abbildung 3.36: Quantifizierung der absoluten Zellzahl bezogen auf 1g Lebergewicht von $\gamma\delta$ T-Zellen ($\gamma\delta$ TCR⁺), CD4⁺ T-Helferzellen (CD3⁺, CD4⁺), T_H17 Zellen (IL-17A⁺, IFN- γ ⁻), T_H1 Zellen (IL-17A⁻,

IFN-γ⁺) und IFN-γ produzierende T_H17 Zellen (IL-17A⁺, IFN-γ⁺) im Lebergewebe von *Mdr2^{-/-}*, *Il22^{-/-}*/*Mdr2^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}/Mdr2^{-/-}* Tieren im Alter von 68 Wochen mit Hilfe des Programms FlowJo. Angaben +/- SEM; n =6-11; * p = < 0,05; *** p = < 0,001.

Die $Mdr2^{-/-}$ Tiere zeigten eine höhere Anzahl an Granulozyten, Monozyten und dendritischen Zellen. Dagegen wiesen die $Il22^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ und $Il22bp^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ Tiere mehr IFN- γ produzierende T-Zellen auf. Limitierend ist, dass nur sechs $Mdr2^{-/-}$ Kontrolltiere zur Verfügung standen, sodass eine weitere Überprüfung der Zusammensetzung der Immunzellen notwendig ist.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle von IL-22 und IL-22BP nach akuter Leberschädigung im Ischämie-Reperfusionsmodell, in der Acetaminophen-induzierten Hepatoxizität und im Regenerationsprozess nach einer partiellen Hepatektomie untersucht. Des Weiteren wurde die Funktion von IL-22 und IL-22BP in der Tumorentwicklung während eines chronischen Gewebeschadens näher analysiert. Mit Hilfe von speziellen Mauslinien, die unter anderem eine Deletion von *Il22* und *Il22bp* aufwiesen, konnte der Einfluss im Entzündungs- und Regenerationsprozess sowie in der Karzinogenese überprüft werden. Darüber hinaus wurde die zelluläre Quelle von IL-22 und IL-22BP im akuten Leberschädigungsmodell identifiziert und der zugrundeliegende Mechanismus der IL-22 abhängigen verstärkten Leberschädigung untersucht.

4.1 Der Einfluss von IL-22 und IL-22BP auf die Regeneration und Inflammation während einer akuten Leberschädigung

Verschiedene Studien haben bereits gezeigt, dass IL-22 vor allem eine protektive Funktion während eines akuten Leberschadens aufweist. Das Zytokin kann durch die Aktivierung von STAT3 die Proliferation und das Überleben der Hepatozyten nach einer Leberschädigung fördern^{139,140}. Zusätzlich kann IL-22 in verschiedenen Toxininduzierten Hepatitismodellen vor Apoptose schützen¹⁴⁶. Des Weiteren verstärkt es die Produktion von Akute-Phase-Proteinen und unterstützt die Expression von Antioxidantien^{138,140,145}. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass IL-22 die Ausbildung einer nichtalkoholischen Steatohepatitis vermindert^{181,182} und den oxidativen Stress sowie die Inflammation in einer Alkohol-induzierten Leberschädigung verringern kann^{141,145}. Zudem wurde in Experimenten nachgewiesen, dass IL-22 direkt auf Leberstammzellen einwirkt und somit die Proliferation dieser Zellen aktivieren könnte¹³⁷.

Dagegen sprechen Untersuchungen, die auf einen negativen Einfluss von IL-22 hindeuten. In bestimmten Erkrankungen wie beispielsweise während der Psoriasis, rheumatoiden Arthritis und in der von T_H17 -Zellen abhängigen Kolitis zeigte IL-22 auch pathogene Eigenschaften^{80,101,128,130,183,184}. Überdies konnte in chronischen Lebererkrankungen mit viralen Hepatiden eine pro-inflammatorische Funktion von IL-

22 nachgewiesen werden^{148,185}. Es gibt Hinweise darauf, dass IL-22 die Entstehung der Fibrose fördern kann, indem es die Chemokinexpression in einem transgenen HBV-Modell steigert und somit die Migration von inflammatorischen T_H17 Zellen in die Leber unterstützt¹⁴⁸. Des Weiteren konnte auch eine positive Korrelation zwischen hohen systemischen IL-22 Konzentrationen im Serum und Patienten mit fortgeschrittener Leberzirrhose sowie einer ebenso niedrigen Überlebensrate festgestellt werden¹⁸⁶. Dementsprechend kann IL-22 je nach Kontext sowohl protektive als auch pathogene Eigenschaften aufweisen. Die Kontrolle von IL-22 ist somit von entscheidender Bedeutung.

Es gibt verschiedene Mechanismen, die die Expression und Wirkung von IL-22 regulieren können. Im Darm wurde bereits gezeigt, dass Zytokine wie IL-6 und IL-23 die Produktion von IL-22 induzieren können^{99,187}. Des Weiteren kann die Expression des IL-22 Rezeptors beispielsweise durch die Stimulation mit Lipopolysacchariden in der Leber hochreguliert werden¹⁸⁸. Darüber hinaus kann IL-22BP das Zytokin IL-22 binden und neutralisieren. Die Funktion des endogenen Inhibitors IL-22BP wurde in der Leber jedoch bisher noch nicht untersucht. Es gibt jedoch zahlreiche Untersuchungen die IL-22 und IL-22BP im Darm bereits untersucht haben. Hierbei wurde gezeigt, dass IL-22 auch im Darm eine wichtige Funktion in der Wundheilung, anti-mikrobiellen Abwehr und für die Mukusproduktion erfüllt¹⁸⁹, sodass ein Fehlen dieses Faktors negative Folgen haben kann¹²⁶. Jedoch ist die Kontrolle des Zytokins ebenso entscheidend, da IL-22 einen starken Einfluss auf die Proliferation des Darmepithels besitzt¹⁹⁰. Diese duale Funktion und folglich die Bedeutung der Kontrolle von IL-22 durch IL-22BP wurde bereits in einem Kolitis-assoziierten Kolonkarzinommodell dargestellt. Zum einen führt die Deletion von Il22 zu einer verstärkten Inflammation im Darm und fördert dadurch indirekt die Tumorigenese. Zum anderen weisen Il22bp^{-/-} Tiere eine verstärkte IL-22- induzierte Tumorzellproliferation und somit ebenfalls eine verstärkte Tumorentwicklung auf¹³⁶. Die Kontrolle von IL-22 mit Hilfe von IL-22BP in diesem Kolitis-assoziierten Kolonkarzinommodell ist somit unerlässlich¹³⁶. Basierend auf diesen Daten wurde in dieser Arbeit der Einfluss von IL-22BP auf die Kontrolle von IL-22 in verschiedenen Lebererkrankungen untersucht.

4.1.1 Expressionsmuster von Il22, Il22bp und Il22r1 während einer akuten Leberschädigung

Zu Beginn wurde die hepatische Expression von *Il22*, *Il22bp* und *Il22r1* in den verschiedenen Leberschädigungsmodellen analysiert. Unsere Daten zeigten, dass die Genexpression von Il22 im gesamten Gewebe einer gesunden Leber nicht detektierbar ist. Dagegen konnte nach einer Schädigung der Leber eine Hochregulierung der Il22 Expression festgestellt werden. Die Genexpression von *Il22bp* und *Il22r1* blieb sowohl vor als auch nach der induzierten Leberschädigung auf einem konstant gleichen Niveau. In Übereinstimmung mit anderen Studien konnte gezeigt werden, dass das Gen 1122 nach Induktion eines Gewebeschadens in der Leber hochreguliert wird^{144,191}. Il22r1 wies im Gegensatz zu vorherigen Studien keine Expressionsveränderung nach dem Leberschaden auf. Es konnte bereits von anderen Gruppen eine erhöhte Il22r1 Expression nach einem IR-induziertem Gewebeschaden und im Anschluss an eine partielle Hepatektomie nachgewiesen werden^{191,192}. Die Unterschiede in der untersuchten Genexpression von Il22r1 können allerdings auch auf eine veränderte Versuchsdurchführung zurückzuführen sein. Die Expression von *Il22bp* wurde bisher in der Leber noch nicht überprüft. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass in einem DSSinduzierten Kolitismodell während der Entzündungsphase Il22bp herunterreguliert wird und im Gegensatz dazu eine Hochregulation von *Il22* stattfindet¹³⁶. Jedoch konnte trotz der Hochregulation von Il22 nach dem Leberschaden keine Regulation der Il22bp Expression festgestellt werden. Es liegt daher nahe, dass die Expression von Il22bp gewebeabhängig unterschiedlich reguliert werden kann. Einige Daten weisen darauf hin, dass unter anderem das inflammatorische Milieu und das Mikrobiom des Darms eine entscheidende Rolle dabei spielen könnten¹³⁶.

4.1.2 Zelluläre Quelle von Il22 und Il22bp nach einem IR-Schaden

Unsere Ergebnisse deuten auf eine wichtige Funktion von IL-22BP in der Kontrolle von IL-22 nach der IR-vermittelten Leberschädigung hin. In diesem Zusammenhang wurde die zelluläre Quelle von *Il22* und *Il22bp* sowohl vor als auch nach dem Leberschaden identifiziert. Die Überprüfung der einzelnen Zellpopulationen verdeutlichte, dass *Il22* vor allem von T-Zellen, Ly6G⁺ CD11b⁺ Granulozyten und Ly6C⁺ CD11b⁺ Monozyten produziert wurde.

In der Leber sind bisher verschiedene Zelltypen beschrieben worden, die die Fähigkeit besitzen IL-22 zu exprimieren. $\gamma\delta$ T-Zellen und NK-Zellen können in einem Infektionsmodell zur Produktion von IL-22 beitragen¹⁹³. Zudem wurde gezeigt, dass ILCs nach einer partiellen Hepatektomie das Zytokin exprimieren können¹⁹⁴. Darüber hinaus sind auch NKT-Zellen, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen als zelluläre Quelle von IL-22 in der Leber beschrieben worden¹⁹⁵. Überdies konnte bereits in anderen Organen gezeigt werden, dass während einer Kolitis ebenso neutrophile Granulozyten IL-22 exprimieren können und auch Makrophagen/ Monozyten die Fähigkeit besitzen IL-22 zu produzieren^{100,101}.

Die zelluläre Quelle von IL-22BP in der Leber wurde bisher noch nicht untersucht. Das Ergebnis zeigte, dass vor allem Ly6G⁺ CD11b⁺ Granulozyten sowohl im gesunden Zustand als auch nach dem IR-vermittelten Schaden *Il22bp* exprimieren. Hinzukommend konnte auch auf RNA-Ebene die Expression von *Il22bp* in T-Zellen und dendritischen Zellen nachgewiesen werden. Nach dem Leberschaden wurde die Expression in allen untersuchten Zellpopulationen hochreguliert. Die untersuchten Immunzelltypen migrieren nach dem IR-induzierten Schaden vermutlich vermehrt in die Leber und verstärken somit die *Il22bp* Expression. Jedoch war dieser Effekt hinsichtlich des gesamten Lebergewebes nicht nachweisbar. Der größte Teil des Gewebes besteht aus Hepatozyten, die höchstwahrscheinlich nicht an der Produktion von *Il22bp* beteiligt sind, wodurch das Expressionsniveau in der gesamten Leber stabil blieb.

Die zelluläre Quelle von IL-22BP ist bisher in anderen Organen nur im Darm beschrieben worden. Untersuchungen zeigen, dass größtenteils dendritische Zellen zur Produktion von IL-22BP beitragen¹³⁶. Nach einem Gewebeschaden im Darm können darüber hinaus auch eosinophile Granulozyten und CD4⁺ T-Zellen das Protein exprimieren^{153,154}. Zusammenfassend wird IL-22 und IL-22BP von verschiedenen Immunzellen in der Leber produziert. Jedoch scheint die zelluläre Quelle vom Organ abhängig zu sein.

4.1.3 Funktion von IL-22 und IL-22BP während der Regeneration nach einer IR-induzierten Leberschädigung

Mit Hilfe des IR-induzierten Leberschädigungsmodells wurde die Funktion von IL-22

und IL-22BP sowohl in der Leberregeneration als auch während der Entzündungsphase untersucht. Interessanterweise konnten keine Unterschiede hinsichtlich des Leberschadens und der Proliferationsrate zwischen Wildtypen und *Il22^{-/-}* Tieren festgestellt werden. Dieses Ergebnis wurde von einer Gruppe bestätigt, die nach der Behandlung mit einem neutralisierenden Antikörper gegen IL-22 keinen Effekt in diesem Modell nachweisen konnte. Es gab dabei keinen Unterschied im Ausmaß der Leberschädigung zwischen der Kontrollgruppe und den Tieren die zuvor mit dem Antikörper behandelt worden waren¹⁹². Allerdings weisen Daten von verschiedenen Arbeitsgruppen auch auf eine protektive Funktion von IL-22 in der IR-vermittelten Leberschädigung hin. Untersuchungen zeigten, dass die einmalige Vorbehandlung mit rekombinanten IL-22 Protein die Leberschädigung nach IR vermindern kann¹⁹². Darüber hinaus können RORγt⁺ NKp46⁺ Zellen, die IL-22 produzieren den IRvermittelten Leberschaden reduzieren¹⁹⁶.

Im Gegensatz dazu zeigten *Il22bp^{-/-}* Tiere im Vergleich zu den Wildtypen einen verstärkten Leberschaden nach IR. Die anhaltende Regeneration der Leber war 48 h nach IR weiterhin durch eine große Anzahl an proliferierenden Hepatozyten gekennzeichnet. Der erhebliche Leberschaden könnte eine Erklärung für die hohe Proliferationsrate in den *Il22bp^{-/-}* Tieren sein. Das Ausmaß der Leberschädigung in den *Il22^{-/-}/Il22bp^{-/-}* und *Il22^{-/-}* Tieren war ähnlich ausgeprägt und darüber hinaus wesentlich geringer als in den *Il22bp^{-/-}* Tieren. Diese Daten zeigen, dass der Effekt des verstärkten Leberschadens in den *Il22bp^{-/-}* Tieren von IL-22 abhängig ist.

Die Ursache der verschiedenen Beobachtungen in unseren Untersuchungen und den Studien könnten auf einen veränderten Versuchsaufbau, insbesondere durch die Verabreichung hoher Dosen rekombinanten Proteins, die verlängerte Ischämiezeit sowie der Zeitpunkt der Probennahme zurückzuführen sein. Eine weitere mögliche Erklärung ist die Expressionsstärke von *Il22*, die von dem jeweiligen Mikrobiom^{97,197} und daher von den Haltungsbedingungen abhängig ist. Dementsprechend ist es möglich, dass IL-22 durch IL-22BP in Wildtypen mit niedriger Expression von IL-22 vollständig inhibiert wird, während dies bei Wildtypen mit einem hohem Expressionslevel von IL-22 nicht der Fall sein könnte.

Zusammenfassend kann endogenes IL-22 die Leberregeneration potentiell fördern, ist jedoch nicht essentiell für die Regeneration in diesem Model. Der verstärkte

Leberschaden der *Il22bp^{-/-}* Tiere impliziert, dass das endogene IL-22 sogar einen pathogenen Einfluss auf die Regeneration nach dem IR-induzierten Schaden haben kann, wenn es nicht durch IL-22BP kontrolliert wird. Folglich deuten die Daten daraufhin, dass IL-22 Kontext-abhängig sowohl protektive als auch pathogene Eigenschaften in der Leberregeneration haben kann.

4.1.4 Pro-inflammatorischer Einfluss von IL-22 durch fehlende Kontrolle von IL-22BP nach einem IR-vermittelten Leberschaden

Wir konnten zeigen, dass die fehlende Kontrolle von IL-22 durch die Deletion von *Il22bp* eine erhöhte Leberschädigung im Vergleich zu den Wildtypen bewirkte. Für die Untersuchung des Mechanismus einer verstärkten Leberschädigung ergab eine Überprüfung der Leukozytenzusammensetzung, dass vor allem pro-inflammatorische Monozyten (Ly6C^{high} und CD11b⁺) und CD11c⁺ CD11b⁺ dendritische Zellen 12 h nach dem IR Schaden vermehrt in der Leber von *Il22bp^{-/-}* Tieren nachgewiesen werden konnten. Zirkulierende Monozyten werden mit Hilfe von Chemokinen aus dem Blut in die Leber rekrutiert und können das Gewebe nach der Reperfusion zusätzlich schädigen^{158,198}. Inflammatorische Monozyten haben unter anderem die Eigenschaft pro-inflammatorische Zytokine wie TNF-a und IL-1ß freizusetzen und sowohl proteolytische Enzyme als auch reaktive Sauerstoffspezies zu produzieren¹⁹⁹. Die Rolle von dendritischen Zellen nach einer IR wird noch kontrovers diskutiert^{200,201}. Leberresidente dendritische Zellen besitzen die Fähigkeit die Leberschädigung nach IR zu vermindern, während infiltrierende dendritische Zellen die Entzündungsprozesse und den Schweregrad der Nekrose verstärken können²⁰². Somit könnte die Migration der inflammatorischen Monozyten maßgeblich zum Phänotyp der *Il22bp^{-/-}* Tiere nach dem IR-vermittelten Schaden beitragen. Dies lässt vermuten, dass eine unkontrollierte Aktivität von IL-22 in den Il22bp^{-/-} Tieren eine verstärkte Entzündungsreaktion nach einer IR-induzierten Leberschädigung begünstigen kann.

4.1.5 IL-22 abhängige Cxcl10 Überexpression verstärkt die IR-induzierte Leberschädigung

Auf Grund einer verstärkten Rekrutierung von inflammatorischen Monozyten und dendritischen Zellen nach einem IR-induzierten Schaden wurde mit Hilfe der RNA-

Sequenzierung die Expressionsveränderung von verschiedenen Chemokinen in der Leber von $II22bp^{-/-}$ Tieren im Vergleich zu Wildtypen untersucht. Dabei wurde eine Hochregulation von *Cxcl10* in den Lebern der $II22bp^{-/-}$ Tiere unabhängig vom Leberschaden festgestellt. Interessanterweise wurde bereits gezeigt, dass eine Deletion von Cxcl10 die Leberschädigung in diesem Modell stark vermindern kann und somit eine wichtige Rolle in der Pathogenese des IR-Modells einnimmt¹⁷⁹. Dementsprechend haben unsere Untersuchungen gezeigt, dass die Neutralisierung von Cxcl10 mit Hilfe eines Antikörpers den Leberschaden in den $II22bp^{-/-}$ Tieren nach IR-Behandlung vermindert. Die $II22bp^{-/-}$ Tiere zeigten ähnlich wie die Wildtypen weniger Nekroseläsionen und Transaminasen im Blut. Demzufolge konnte ein Cxcl10-abhängiger Mechanismus der verstärkten Leberschädigung in den $II22bp^{-/-}$ Tieren

Cxcl10 kann unter inflammatorischen Bedingungen in der Leber von Hepatozyten exprimiert werden²⁰³⁻²⁰⁶. Neben Monozyten reagieren auch andere Immunzellen wie beispielsweise T-Zellen auf das Chemokin, die ebenso den Leberschaden noch verstärken könnten^{148,207}. In Bezug auf IL-22 konnte in einem HBV-Modell bereits nachgewiesen werden, dass das Zytokin die Expression von Cxcl10 stimuliert und somit die Rekrutierung von T-Zellen aktiviert und den Leberschaden verstärken kann¹⁴⁸. Des Weiteren reduziert die Neutralisierung von IL-22 die Expression von Cxcl10 und kann dadurch die Migration von pro-inflammatorischen Zellen in die Leber verhindern¹⁸⁵. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass IL-22 in einem *in vitro* Experiment unter dem Einfluss von IFN-α den Transkriptionsfaktor STAT1 aktiviert und die Expression von Cxcl10 in verschiedenen Zellen, die auf Grund der Schädigung vom Blut in die Leber migrieren, IFN-α während eines Reperfusionsschadens exprimieren können²⁰¹.

Zusammenfassend verdeutlichen diese und unsere Ergebnisse, dass die fehlende Kontrolle von IL-22 während einer Leberschädigung eine Hochregulation der Cxcl10 Expression bewirkt. Das Chemokin kann wiederum die Rekrutierung von proinflammatorischen Zellen in die Leber unterstützten, wodurch der IR-induzierte Schaden noch verstärkt werden könnte. Die infiltrierenden Monozyten exprimierten darüber hinaus zusätzlich IL-22, sodass die Cxcl10 Produktion durch einen positiven Feedback-Mechanismus noch gesteigert werden könnte. Diese Ergebnisse
veranschaulichen, dass IL-22 höchstwahrscheinlich auch pro-inflammatorische Eigenschaften in der akuten Leberschädigung aufweist²⁰⁹ und somit die Kontrolle des Zytokins durch IL-22BP einen entscheidenden Einfluss haben könnte.

4.1.6 Protektiver Einfluss von IL-22 auf die Regeneration nach einem APAP-induzierten Leberschaden

Die bisherigen Ergebnisse deuten auf eine potentielle pathogene Funktion von IL-22 nach einem akuten Leberschaden hin. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde in einem weiteren akuten Leberschädigungsmodell die Rolle von IL-22 und IL-22BP erneut analysiert. Im Gegensatz zu den Untersuchungen im IR-Modell wiesen APAP behandelte $Il22^{-/-}$ und $Il22bp^{-/-}$ Tiere einen signifikant stärkeren Leberschaden im Vergleich zu den Wildtypen auf. Der Leberschaden der *Il22^{-/-}* Tiere war in diesem Zusammenhang genauso stark ausgeprägt wie die Leberschädigung in den Il22bp^{-/-} Tieren. Des Weiteren konnte auch eine verzögerte Regeneration in den Il22^{-/-} und *Il22bp^{-/-}* Tieren nachgewiesen werden. Alle drei Mauslinien zeigten 24 h nach APAP Injektion einen ähnlich ausgeprägten Leberschaden und auch die Anzahl proliferierender Hepatozyten wies keine Unterschiede auf. 48 h nach APAP Behandlung konnte hingegen in den Wildtypen weiterhin Nekrose und erhöhte ALT-Spiegel in den 1122^{-/-} und 1122bp^{-/-} Tieren beobachtet werden. Darüber hinaus wurde nach 48 h im Gegensatz zu den Wildtypen eine hohe Proliferationsrate der Hepatozyten nachgewiesen. Der Befund, dass *Il22^{-/-}* Tiere in einem T-Zell vermittelten Hepatitis-Modell ebenfalls einen größeren Leberschaden aufweisen, wurde bereits in einer vorherigen Studie bestätigt¹⁴⁴. Die per se verminderte STAT3 Phosphorylierung in den *Il22^{-/-}* Tieren und ebenfalls schwach ausgeprägte STAT3-Aktivierung nach der APAP-Behandlung könnte eine verzögerte Regeneration des Leberparenchyms nach 48 h erklären. Das Fehlen von IL-22 bewirkte vermutlich eine verringerte STAT3-abhängige Induktion von mitogenen und anti-apoptotischen Proteinen. Dieser Signalweg scheint allerdings in diesem Modell für die Leberregeneration von stärkerer Bedeutung zu sein. Passend hierzu hat eine Untersuchung gezeigt, dass die einmalige Gabe von rekombinanten IL-22 Protein vor der APAP Injektion eine Aktivierung von STAT3 initiert und somit die Proliferation und das Überleben der Hepatozyten unterstützten kann²¹⁰. Dieser protektive Effekt wird wiederum durch eine Deletion des

Transkriptionsfaktors STAT3 in der Leber aufgehoben¹⁶⁹. Allerdings erzielte die tendenziell stärkere Phosphorylierung von STAT3 in den *Il22bp^{-/-}* Tieren nach der APAP Behandlung keinen zusätzlichen kompensatorischen Effekt in der Leberregeneration. Vielmehr zeigten *Il22bp^{-/-}* Tiere einen höheren Leberschaden, was eine zusätzliche pathogene Funktion von unkontrolliertem IL-22 vermuten lässt. Es ist jedoch unklar welche Mechanismen diesem Befund zugrunde liegen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass IL-22 in diesem Modell kontextabhängig sowohl protektive Eigenschaften in der Leberregeneration aufweist als auch eine pathogene Rolle in der APAP-induzierten Leberschädigung einnehmen kann. Daher ist eine strikte Kontrolle der Aktivität von IL-22 durch IL-22BP von essentieller Bedeutung.

4.1.7 Pathogene Funktion von IL-22 während der APAP-induzierten Hepatoxizität

Die Untersuchung der APAP-vermittelten Leberschädigung zeigte, dass *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Tiere im Vergleich zu den Wildtypen einen stärker ausgeprägten Leberschaden aufwiesen. Einerseits war die Regeneration in den *Il22^{-/-}* Tieren beeinträchtigt. Demnach besitzt IL-22 wahrscheinlich einen protektiven Effekt. Allerdings ist unklar wie IL-22 in den *Il22bp^{-/-}* Tieren die Pathogenese in diesem Modell ebenso auch fördern kann.

Auf Grund einer Cxcl10-abhängigen Leberschädigung in den *Il22bp^{-/-}* Tieren im IR-Modell wurde die Expression des Chemokins im APAP-Modell analysiert. Eine Überprüfung der hepatischen Cxcl10 Expression ergab jedoch keinen Unterschied zwischen Wildtypen und *Il22bp^{-/-}* Tieren nach APAP-Injektion. Es konnte darüber hinaus auch gezeigt werden, dass Cxcl10 höchstwahrscheinlich eine protektive Funktion in diesem Modell aufweist^{211,212}. Dementsprechend könnte eine andere Ursache für die verstärkte Leberschädigung verantwortlich sein.

Eine Studie, die ein transgenes Mausmodell verwendet, in dem IL-22 in der Leber überexprimiert wird, bestätigte den von uns beobachteten protektiven sowie pathogenen Einfluss von IL-22. Zum einen schützte eine einmalige Vorbehandlung mit rekombinanten IL-22 in Wildtypen vor einem massiven Leberschaden durch die APAPvermittelte Hepatoxizität, zum anderen wiesen die transgenen Tiere mit dauerhaft erhöhtem IL-22 Spiegel eine vergleichsweise stärkere Leberschädigung auf¹⁶⁹. Die chronische Überexpression von IL-22 in der Leber führt per se zu einer erhöhten Expression des Cytochroms 2E1¹⁶⁹. Das Cytochrom 2E1 in den Hepatozyten wandelt APAP zu dem toxischen Stoffwechselprodukt NAPQI um. Überschüssiges NAPQI bindet an Leberproteine und führt zu oxidativen Stress, Dysfunktion der Mitochondrien, DNA-Schaden und Zelltod²¹³. Die Hochregulation von Cytochrom 2E1 ist STAT3 unabhängig und die Deletion des Cytochroms reduziert die vermehrte Entstehung des toxischen Metabolit NAPQI und kann somit den APAP-vermittelten Leberschaden in den IL-22 transgenen Mäusen verringern. Eine STAT3 Deletion in der Leber der transgenen Tiere zeigte in der Studie keine Besserung im Ausmaß der Leberschädigung¹⁶⁹. Unsere Analyse der *Cyp2e1* Expression im Lebergewebe der *Il22bp^{-/-}* Tiere im Vergleich zu den Wildtypen ergab jedoch keine Hochregulierung der Expression von Cyp2e1 im gesunden Zustand sowie nach APAP-induzierter Leberschädigung. Die niedrige Expression nach der APAP-Injektion könnte auf die weitreichende Zerstörung des Leberparenchyms oder auf einen negativen Feedback-Mechanismus zurückzuführen sein. Die Metabolisierung von APAP beginnt allerdings bereits schon 2 h nach der Behandlung²¹⁴. Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass bereits nach 6 h ein Teil der Hepatozyten abgestorben war, sodass der gewählte Zeitpunkt für die Expressionsanalyse von 8 h auch zu spät sein könnte. Die endogene Expression von IL-22 ist in der Leber in unseren Versuchen tendenziell sehr niedrig. Mittels Überexpression und Applikation von rekombinanten Protein kann die IL-22-Konzentration im Serum und in der Leber massiv erhöht sein^{169,210}, sodass die physiologischen Auswirkungen nicht abschätzbar sind. Dies könnte erklären, warum die transgenen Tiere per se eine hohe Cytochrom 2E1 Expression aufweisen.

Ein zweiter möglicher Mechanismus könnte ebenso durch die verstärkte STAT3 Aktivierung in den *Il22bp^{-/-}* Tieren verursacht werden. Es ist bereits bekannt, dass STAT3 nicht nur die Regeneration fördert²¹⁵, sondern auch eine pro-inflammatorische Funktion in der akuten Leberschädigung einnehmen kann²¹⁶. Jedoch ist diese Funktion sehr stark vom Zelltyp abhängig. Eine STAT3 Aktivierung in Hepatozyten kann den Entzündungsvorgang nach einem akuten Leberschaden verstärken, während die Aktivierung von STAT3 in myeloiden Zellen die Inflammation vermindert²¹⁷. Dabei konnte beobachtet werden, dass eine Inaktivierung von STAT3 in Hepatozyten zu einer geringeren Rekrutierung von inflammatorischen Zellen führen kann und weniger proinflammatorische Zytokine freigesetzt werden²¹⁷. Hepatozyten tragen auf ihrer Oberfläche den IL-22R1 und können somit direkt auf IL-22 reagieren¹³⁹. Eine STAT3 gesteigerte Aktivierung von kann somit möglicherweise den Entzündungsprozess verstärken. Die Überprüfung der Immunzellpopulationen 6 und 24 h nach der APAP-Injektion ergab allerdings keinen maßgeblichen Hinweis auf eine verstärkte Infiltration von pro-inflammatorischen Immunzellen in die Leber der *Il22bp^{-/-}* Tiere. Jedoch ist es möglich, dass zu einem anderen Zeitpunkt die Migration proinflammatorischer Zellen stattfindet und somit den verstärkten Leberschaden erklären könnte.

Die immunologischen Mechanismen in der APAP-vermittelten Leberschädigung sind noch unzureichend untersucht. Die Aktivierung von Kupffer-Zellen durch den APAPinduzierten Zelltod der Hepatozyten setzt eine große Anzahl von Zytokinen und Chemokinen frei. Somit werden verschiedene Immunzellen wie neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, NKT-Zellen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in die Leber rekrutiert¹⁷⁰. Unsere Überprüfung der Leukozytenzusammensetzung konnte aufzeigen, dass tendenziell weniger dendritische Zellen und NK-Zellen in die Leber der *Il22bp^{-/-}* Tiere migrierten. Es ist bekannt, dass dendritische Zellen positive Eigenschaften im APAP-vermittelten Leberschaden aufweisen können, indem sie die Aktivierung von NK-Zellen und neutrophilen Granulozyten reduzieren²¹⁸. Demnach könnte eine verminderte Anzahl von dendritischen Zellen den Entzündungsprozess verstärken. Im Gegensatz dazu können NK-Zellen durch die Produktion von IFN-y die Schädigung des Lebergewebes verschlimmern²¹⁹. Es gibt einige Hinweise, dass IFN- γ entscheidend zur Pathogenese beitragen kann²²⁰. Allerdings ist die zelluläre Quelle von IFN- γ im APAP-Modell noch nicht ausreichend untersucht worden²²¹. Daher ist auch die Funktion von NK-Zellen im APAP-Modell weiterhin unklar¹⁷⁰. Die Infiltration der Immunzellen sollte in weiteren Experimenten analysiert werden, da eine Beteiligung an der verstärkten Leberschädigung nicht ausgeschlossen werden kann.

Die Funktion von IL-22 in diesem Leberschädigungsmodell konnte anhand der Ergebnisse nicht ausreichend geklärt werden. Die Deletion von IL-22 führte höchstwahrscheinlich auf Grund der verminderten STAT3-Aktivierung zu einer Beeinträchtigung der Regeneration. IL-22 wirkt direkt durch Stimulation von antiapoptotischen Genen auf das Überleben der Hepatozyten ein und kann somit zudem auch vor einer Nekrose-bedingten Inflammation schützen¹³⁹. *Il22bp^{-/-}* Tiere wiesen darüber hinaus ebenso einen verstärkten Leberschaden auf. Jedoch ist immer noch unklar, wie die unkontrollierte Aktivität von IL-22 in diesem Modell den Gewebeschaden und die Regeneration negativ beeinflusst. Weitere Untersuchungen sind daher notwendig, um diesen Mechanismus aufzuklären.

4.1.8 Einfluss von IL-22 und IL-22BP auf die Leberregeneration nach einer partiellen Hepatektomie

Die sowohl protektive als auch pathogene Funktion von IL-22 wurde im IR- und APAP-Modell bereits eingehend untersucht. Allerdings wird in beiden Modellen die Leberregeneration durch Faktoren wie Nekrose und oxidativen Stress beeinträchtigt. Mit Hilfe des Modells der partiellen Hepatektomie konnte der Prozess der Regeneration mit weniger zusätzlichen Einflussfaktoren analysiert werden. Die Auswertung unserer Messdaten zeigte, dass das Lebervolumen der Wildtypen, *Il22^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}* Tiere während der Regeneration zu keinem untersuchten Zeitpunkt Abweichungen aufwies. Somit war die Regenerationsfähigkeit nach der partiellen Hepatektomie auf Grund der unterschiedlichen Genotypen weder beschleunigt noch verzögert. Unsere Daten verdeutlichen, dass eine Deletion von *Il22* keinen essentiellen Einfluss auf die Leberregeneration nach einer partiellen Hepatektomie besitzt.

Studien haben jedoch bereits gezeigt, dass IL-22 eine wichtige Rolle in der Leberregeneration einnimmt. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen zeigte eine Studie, dass $II22^{-/-}$ Tiere eine verzögerte Regeneration aufweisen. Jedoch zeigte der Nachweis der Proliferationsrate, dass nur nach 48 h die Regeneration in den $II22^{-/-}$ Tiere zeigen beeinträchtigt ist. Nach 72 h ist der Effekt nicht mehr vorhanden und $II22^{-/-}$ Tiere zeigen sogar mehr proliferierende Hepatozyten im Vergleich zu den Wildtypen¹⁹⁴. Des Weiteren konnte eine andere Arbeitsgruppe nachweisen, dass die Anwendung eines neutralisierenden Antikörpers gegen IL-22 die Hepatozytenproliferation nach einer partiellen Hepatektomie vermindern kann. Die Applikation von exogenem IL-22 hatte in dieser Studie allerdings keinen Einfluss auf die Regeneration¹⁹¹. Darüber hinaus soll IL-22, welches von $\gamma\delta$ T–Zellen nach der partiellen Hepatektomie produziert wird, die Leberregeneration ebenso unterstützen. So zeigen Tiere, die keine $\gamma\delta$ T–Zellen

aufweisen, eine verschlechterte Regenerationsfähigkeit. Dieser Zustand konnte mit Hilfe der Gabe von rekombinanten IL-22 wieder verbessert werden²²². Ein weiterer Beleg für eine wichtige Funktion von IL-22 konnte durch die gezielte Überexpression von IL-22 in der Leber dargestellt werden. Die transgenen Tiere zeigten nach einer partiellen Hepatektomie höchstwahrscheinlich auf Grund der verstärkten STAT3 Aktivierung im Lebergewebe eine höhere Proliferationsrate der Hepatozyten¹⁴⁰.

Die Funktion von IL-22BP wurde in diesem Modell bisher noch nicht untersucht. Die Deletion von *Il22bp* hatte nach einer partiellen Hepatektomie keinen signifikanten Einfluss auf die Leberregeneration. Es konnte keine maßgeblich erhöhte Proliferationsrate der Hepatozyten in den *Il22bp^{-/-}* Tieren nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu haben Vorarbeiten bereits gezeigt, dass *Il22bp^{-/-}* Tiere in einem DSS-induzierten Kolitismodell eine gesteigerte Proliferation von Epithelzellen im Darm aufweisen können¹³⁶.

Die verschiedenen Studien über den Einfluss von IL-22 nach einer partiellen Hepatektomie konzentrieren sich hauptsächlich auf die Regenerationsphase zwischen 36 und 72 h. Nur eine Studie hat die Auswirkung von endogenem IL-22 nach einer partiellen Hepatektomie untersucht, allerdings konnte nur nach 48 h eine positive Funktion von IL-22 nachgewiesen werden¹⁹⁴. Darüber hinaus gibt es keinen Anhaltspunkt, inwiefern die Proliferation zu einem späteren Zeitpunkt von IL-22 beeinflusst wird und ob ein entscheidender Unterschied am Ende der Regeneration nach 6 bis 7 Tagen zwischen Wildtypen und *II22^{-/-}* Tieren existiert. In keiner vorherigen Studie wurde das gesamte Lebervolumen erfasst und bis zum Erreichen des Ausgangsvolumens beobachtet.

Es ist daher möglich, dass die Überexpression oder Verabreichung von IL-22 zu Beginn der Regenerationsphase sich positiv auf das Leberwachstum auswirken kann. Jedoch könnte das Fehlen des Zytokins letztendlich durch andere Signalwege kompensiert werden⁶, sodass das endogene IL-22 daher keine essentielle Funktion für die Leberregeneration nach einer partiellen Hepatektomie besitzt. Darüber hinaus ist die Kontrolle von IL-22 durch IL-22BP in diesem Model nicht von essentieller Bedeutung. Daher liegt es nahe, dass die Regeneration und Terminierung des Wachstumsprozesses durch andere IL-22-unabhängige Mechanismen reguliert werden. Zusammenfassend wurden die positiven Eigenschaften von IL-22 während der Leberschädigung in vielen Modellen zuvor bereits untersucht^{139,140,144}. Allerdings gibt es nur wenige Anhaltspunkte auf eine pathogene Funktion von IL-22 in der Leber²²³. Erstaunlicherweise zeigten unsere Untersuchungen von akuten Leberschädigungsmodellen, dass IL-22 wahrscheinlich eine duale Funktion aufweist. Einerseits kann IL-22 die Regeneration im APAP-Modell begünstigen, andererseits konnte auch ein negativer Einfluss von IL-22 im IR- und APAP-Modell nachgewiesen werden. Darüber hinaus spielt das endogene IL-22 in der Regeneration nach einer partiellen Hepatektomie vermutlich keine entscheidende Rolle. Die Funktion von IL-22 kann mitunter sehr stark von der Inflammation und dem intrahepatischen Milieu in dem induzierten Leberschaden abhängig sein. Daher scheint eine strikte Regulierung von IL-22 durch IL-22BP notwendig, um pro-inflammatorische Effekte zu unterbinden und eine ungehinderte Leberregeneration zu gewährleisten.

4.2 Die Funktion von IL-22 und IL-22BP während der Hepatokarzinogenese im *Mdr2^{-/-}* Modell

Für die Untersuchung der Funktion von IL-22 und IL-22BP in der Hepatokarzinogenese wurden *Mdr2^{-/-}* Tiere verwendet. In diesem Modell entwickeln die Tiere auf Grund einer vorangegangenen chronischen Entzündung und fibrotischen sowie zirrhotischen Gewebeveränderungen ein hepatozelluläres Karzinom.

Unsere Vermutung war, dass durch eine Deletion von *Il22bp* die unkontrollierte Aktivität von IL-22 das Tumorwachstum in den *Mdr2^{-/-}* Tieren fördern könnte. Diese Vermutung beruht auf bereits publizierten Arbeiten, die gezeigt haben, dass IL-22 ein regeneratives Programm induzieren kann, das – sofern unkontrolliert – möglicherweise zum Tumorwachstum beiträgt^{94,224-226}. STAT3 ist hierbei ein wichtiges Zielmolekül im Signalweg des IL-22-IL-22R1 Systems⁹⁴. Der Transkriptionsfaktor ist als potentielles Onkogen bekannt und spielt somit in der Karzinogenese eine entscheidende Rolle²²⁷. Hierbei ist wichtig, dass eine Überexpression von IL-22 in der Leber oder im Fettgewebe nicht per se zu einer Tumorentwicklung führt^{140,228}. Vielmehr kann IL-22 die Entwicklung von Tumoren, die durch spezifische Trigger induziert worden sind, beschleunigen²²⁹.

Viele Faktoren können die Entwicklung von Tumoren begünstigen. In der Leber sind

vor allem chronische Entzündungen mit fibrösen und zirrhotischen Veränderungen eine entscheidende Ursache. Folglich könnte IL-22, indem es die Entstehung der Fibrose oder Zirrhose beeinflusst, auch ein wichtiger Faktor für die Karzinogenese in der Leber sein. Allerdings wird die Funktion von IL-22 in der Leberfibrose kontrovers diskutiert²³⁰. Zwei Arbeiten deuten darauf hin, dass IL-22 überwiegend eine pathogene Rolle in der Fibroseentwicklung während einer chronischen Infektion mit viralen Hepatiden spielt^{231,232}. Folglich könnte eine Deletion von *Il22* die Entwicklung von Tumoren in $Mdr2^{-/-}$ Tieren auch vermindern. Dagegen sprechen Untersuchungen von anderen Arbeitsgruppen, die in einem Alkohol- und chemisch induzierten Fibrosemodell, einen positiven Effekt von IL-22 auf die Leberfibrose nachweisen konnten^{142,143,233,234}. Letztlich gibt es auch humane Studien, die die Rolle von IL-22 in der Leberzirrhose untersucht haben. Diese Daten zeigen, dass hohe IL-22 Konzentrationen im Serum von Patienten mit Leberzirrhose mit einer verringerten Überlebensrate korrelieren¹⁸⁶, was eine pathogene Rolle von IL-22 in der Leberzirrhose vermuten lässt, wobei der Mechanismus in dieser Studie nicht untersucht wurde.

Die Rolle von IL-22BP während der Leberkarzinogenese wurde bislang nicht untersucht. Allerdings konnte in einem Kolitis-assoziierten Kolonkarzinommodell eine wichtige Funktion von IL-22BP nachgewiesen werden. *Il22bp^{-/-}* Tiere zeigten in diesem Modell vermehrt Tumore¹³⁶. Der positive Einfluss von IL-22 auf die Proliferation der Darmepithelzellen¹⁹⁰ könnte somit das Wachstum von Tumoren begünstigen. Dementsprechend ist die Kontrolle von IL-22 mit Hilfe von IL-22BP in diesem Kolitisassoziierten Kolonkarzinommodell von wesentlicher Bedeutung¹³⁶. Basierend auf diesen Vordaten wurde die Funktion von IL-22 und IL-22BP in dem *Mdr2^{-/-}* assoziierten Leberzellkarzinommodell untersucht.

4.2.1 Expressionsanalyse von Il22, Il22r1 und Il22bp im Lebergewebe der Mdr2^{-/-} Tiere

In Vorarbeiten von anderen Gruppen konnte eine gesteigerte Expression von IL-22 und eine große Anzahl von IL-22⁺ infiltrierende Leukozyten im hepatozellulären Karzinom nachgewiesen werden¹⁴⁷. Des Weiteren sind hohe Konzentrationen von IL-22 und eine vermehrte Anzahl an zirkulierenden T_H22 Zellen im Serum von Patienten mit einem Leberzellkarzinom messbar^{235,236}. Wir untersuchten die Expression von IL-22 während der Fibrose und Tumorentstehung. Die Überprüfung der hepatischen Expression von *Il22* im Lebergewebe der $Mdr2^{-/-}$ Tiere zeigte eine relativ schwach ausgeprägte Genexpression im jungen Alter sowie in der Phase der Tumorentstehung. Des Weiteren zeigte die Untersuchung von *Il22r1* eine stabile Expression im zeitlichen Verlauf, die sich während der Phase der Tumorentstehung nicht signifikant veränderte. Eine humane Studie konnte dagegen eine signifikant erhöhte Expression von *Il22r1* in Proben eines hepatozellulären Karzinoms und von zirrhotischem Gewebe im Vergleich zu einer gesunden Leber feststellen¹⁴⁷. Bei unserer Analyse von *Il22bp* wurde ein oszillierendes Expressionsmuster im zeitlichen Verlauf in den Lebern der $Mdr2^{-/-}$ Tiere nachgewiesen. In den $Mdr2^{-/-}$ Tieren konnte jedoch insbesondere nach 68 Wochen keine erhebliche Expressionsänderung detektiert werden. Die Expression von *Il22bp* wurde im hepatozellulären Karzinom bisher nicht untersucht. Allerdings zeigten zwei Studien, dass die Expression von *Il22bp* verstärkt im Tumorgewebe von Patienten mit einem Magenkarzinom und in einem Kolitis-assoziierten Kolonkarzinommodell im Vergleich zu tumorfreiem Gewebe hochreguliert sein kann^{237,238}.

Einschränkend muss erwähnt werden, dass die von uns verwendeten Leberproben für die Expressionsanalyse nicht ausschließlich Tumore, sondern auch tumorfreies Gewebe enthielten. Dies könnte die Unterschiede im Expressionsmuster von *Il22* und *Il22r1* in den $Mdr2^{-/-}$ Tieren im Gegensatz zu den anderen Beobachtungen in der Leber erklären. Zusammenfassend ist die Expression von *Il22* im Tumorgewebe der Leber im Vergleich zu anderen Studien sehr gering ausgeprägt. Darüber hinaus konnte keine Hochregulation von *Il22r1*, wie in anderen Untersuchungen bereits gezeigt, festgestellt werden. Die *Il22bp* Expression war ebenfalls während der Tumorentwicklung in den Lebern der *Mdr2*^{-/-} Tiere nicht signifikant hochreguliert.

4.2.2 Deletion von IL-22 reduziert tendenziell die Tumorentwicklung in den Mdr2^{-/-} Tieren

Für eine Untersuchung der Funktion von IL-22 und IL-22BP wurde die Tumorentstehung in den Lebern der $Mdr2^{-/-}$, $Il22^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ und $Il22bp^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ Tiere ausgewertet. Eine Deletion von Il22 bewirkte in den $Mdr2^{-/-}$ Tieren eine tendenziell verminderte Tumorentwicklung. Diese Daten bestätigen Ergebnissen von einer anderen Arbeitgruppe, die gezeigt hat, dass $Il22^{-/-}$ Tiere in einem Diethylnitrosamine-induzierten

Tumormodell in der Leber eine signifikant verminderte Tumorentwicklung aufweisen¹⁴⁷. Passend zu diesen Daten wurde auch gezeigt, dass bei einer Überexpression von IL-22 in der Leber und der gleichzeitigen Behandlung mit Diethylnitrosamine größere Tumore und eine höhere Anzahl an Tumoren im Vergleich zu den Wildtypen auftreten. Mitogene Proteine wie Cyclin D1 und Bcl-xL sind in dem Tumorgewebe der transgenen Tiere stärker aktiviert. Ebenso ist die STAT3 Phosphorylierung bereits im nicht-tumorösen Gewebe der transgenen Tiere im Gegensatz zu den Wildtypen hochreguliert¹⁴⁰. Zudem wurde mit Hilfe von in vitro Experimenten nachgewiesen, dass IL-22 direkt die Proliferation von humanen Hepatomzellen fördern kann. Die Überexpression von IL-22 in dieser Zelllinie bewirkte mittels STAT3 Aktivierung eine Hochregulierung von zahlreichen mitogenen und antiapoptotischen Proteinen¹⁴⁷. IL-22 könnte ebenso durch die Aktivierung von antiapoptotischen Genen den Zelltod von beschädigten Hepatozyten verhindern und dadurch Veränderungen im Erbgut unterstützen sowie die Tumorentwicklung begünstigen. Des Weiteren ist bekannt, dass die Deletion von Il22 auch einen Einfluss auf das Mikrobiom im Darm besitzt²³⁹. Verschiedene Studien haben bereits gezeigt, dass eine Veränderung in der Zusammensetzung des Mikrobioms und eine verstärkte bakterielle Translokation vom Darm in die Leber die Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms begünstigen kann²⁴⁰⁻²⁴³. Allerdings wurden in unseren Versuchen zusammensitzende Wurfgeschwister verwendet, die daher unabhängig vom Genotyp eine ähnliche Zusammensetzung der Darmflora aufweisen.

Die Rolle von IL-22BP wurde bisher nicht in der Leberkarzinogenese untersucht, sodass wir $II22bp^{-/-}$ Tiere mit $Mdr2^{-/-}$ Tieren kreuzten. In den $Mdr2^{-/-}$ und $II22bp^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ Tieren konnte kein Unterschied im Tumorvolumen und in der Anzahl der Tumore zu den gemessenen Zeitpunkten festgestellt werden. Darüber hinaus zeigte die Proliferationsrate in den verwendeten Gruppen keine Auffälligkeiten. Somit scheint die Kontrolle von IL-22 durch IL-22BP in diesem Tumormodell nicht von entscheidender Bedeutung. Allerdings ist die Expressionsstärke und auch der Effekt von IL-22 vom Mikrobiom abhängig, welches wiederum unter anderem von der Tierhaltung beeinflusst wird. Interessanterweise wiesen die $II22^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ Tiere in unserer Tierhaltung ebenfalls nur eine tendenziell aber nicht signifikant verringerte Tumorentwicklung auf. Es ist daher denkbar, dass andere IL-22 unabhängige Mechanismen einen größeren Einfluss

auf die Karzinogenese in den $Mdr2^{-/-}$ Tieren in unserer Tierhaltung spielen.

Zusammenfassend kann IL-22 mittels STAT3 Aktivierung die Hepatokarzinogenese begünstigen¹⁴⁷. Daher ist ein Kontrollmechanismus zwingend erforderlich. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass einerseits die Deletion von IL-22 in den $Mdr2^{-/-}$ Tieren das Tumorvolumen verringern kann, andererseits zeigte das Fehlen des Inhibitors IL-22BP keinen Effekt. Dementsprechend besitzt IL-22 höchstwahrscheinlich einen pathogenen Einfluss in dem $Mdr2^{-/-}$ -Modell. Die Expression von *Il22* war im gesamten Lebergewebe allerdings sehr gering ausgeprägt, sodass der Effekt von IL-22 in weiteren Experimenten analysiert werden sollte. Die Untersuchungen deuten darauf hin, dass IL-22BP vermutlich keine essentielle Bedeutung in der Regulation von IL-22 in diesem Leberkarzinommodell besitzt, wobei die IL-22 Expression in diesem Model auch niedrig ist. Untersuchungen in weiteren Leberkarzinommodellen mit höheren IL-22 Spiegeln sind nötig, um diese Befunde weiter zu klären.

4.2.3 Charakterisierung von verschiedenen Immunzellen während der Hepatokarzinogenese in den Mdr2^{-/-}Tieren

 $II22^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ zeigten im Gegensatz zu $Mdr2^{-/-}$ und $II22bp^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ Tieren eine tendenziell geringere Tumorentwicklung. Jedoch ist der Mechanismus der verminderten Tumorentstehung unklar. Tumor-infiltrierende Leukozyten können den Verlauf der Hepatokarzinogenese sowohl positiv als auch negativ beeinflussen²⁴⁴⁻²⁴⁶. Die Funktion von Leukozyten in der Pathogenese der $Mdr2^{-/-}$ Tiere ist bisher allerdings wenig untersucht worden. Eine Studie hat bereits gezeigt, dass im Alter von 2-3 Monaten während der Entzündungsphase vor allem Makrophagen/Monozyten und neutrophile Granulozyten in das Lebergewebe migrieren. Des Weiteren befinden sich auch vermehrt T-Zellen im Lebergewebe der $Mdr2^{-/-}$ Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren²⁴⁷. Eine andere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass die verstärkte Rekrutierung von Makrophagen mit Hilfe des Chemokinrezeptors CCR5 die Inflammation und Fibrosierung in der Leber verstärkt und somit zur Tumorentstehung in den $Mdr2^{-/-}$ Tieren beitragen kann²⁴⁸.

Unsere Daten haben gezeigt, dass verstärkt CD11b⁺ Ly6G⁺ Granulozyten und CD11b⁺ Ly6C⁺ Monozyten in das Lebergewebe der $Mdr2^{-/-}$ Tiere migrieren. Im Gegensatz dazu wiesen $Il22^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ und $Il22bp^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ Tiere eine deutlich geringere Anzahl von

CD11b⁺ Ly6G⁺ Granulozyten und CD11b⁺ Ly6C⁺ Monozyten in der Leber auf.

Studien deuten darauf hin, dass neutrophile Granulozyten die Inflammation in der Leber verstärken können und unter anderem die Fähigkeit besitzen pro-angiogenetische Faktoren freizusetzten^{249,250}. Des Weiteren soll eine hohe Anzahl von Tumorinfitrierenden neutrophilen Granulozyten mit einer schlechteren Prognose für das hepatozelluläre Karzinom verbunden sein²⁵¹. In einer neueren Studie konnte gezeigt werden, dass Monozyten durch die Interaktion mit aktivierten hepatischen Sternzellen ihre pro-inflammatorische Eigenschaften verlieren und immunsuppressive sowie tumorfördernde Funktionen übernehmen können²⁵².

Beide Zelltypen könnten somit die Tumorigenese in den $Mdr2^{-/-}$ Tieren unterstützen. Allerdings wiesen $Il22bp^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ Tiere signifikant weniger Granulozyten und Monozyten auf, obwohl die Tumorentstehung in beiden Gruppen ähnlich stark ausgeprägt war. Daher ist unklar, ob CD11b⁺ Ly6G⁺ Granulozyten und CD11b⁺ Ly6C⁺ Monozyten überhaupt die Hepatokarzinogenese in den $Mdr2^{-/-}$ Tiere begünstigen.

Des Weiteren zeigte unsere Untersuchung, dass vor allem die Anzahl von IFN- γ produzierende T_H17 Zellen in den Lebern der *Il22^{-/-}/Mdr2^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}/Mdr2^{-/-}* Tieren im Vergleich zu den *Mdr2^{-/-}* Tieren erhöht waren.

Die Rolle dieses Zelltyps im hepatozellulären Karzinom ist bisher noch nicht bekannt. In einer Studie korrelierte eine erhöhte Anzahl von T_H17 Zellen in Tumoren von Leberkarzinompatienten mit einer niedrigen Überlebensrate. Fast die Hälfte der analysierten Tumor-infiltrierenden T_H17 Zellen produzierte dabei gleichzeitig IFN- γ^{253} . Die anti-tumoralen Eigenschaften von IFN- γ sind bereits ausführlich beschrieben. Doch neuere Studien zeigen auch eine tumorfördernde Wirkung des Zytokins²⁵⁴. Der Einfluss der IFN- γ produzierende T_H17 Zellen auf die Tumorentwicklung in den *Il22^{-/-}/Mdr2^{-/-}* und *Il22bp^{-/-}/Mdr2^{-/-}* Tieren kann jedoch in dieser Untersuchung nicht geklärt werden.

Zusammenfassend zeigte die Analyse der Leukozytenzusammensetzung, dass wahrscheinlich ein anderer Mechanismus an der verminderten Tumorentwicklung in den $II22^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ Tieren beteiligt ist. Es konnte keine spezifische Leukozytenpopulation identifiziert werden, die ausschließlich in den Lebern der $II22^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ Tiere signifikant reduziert oder vermehrt vorzufinden war. Demzufolge müssen weitere Analysen den Mechanismus der reduzierten Tumorentwicklung in den Lebern der $II22^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ Tiere aufklären.

5 Zusammenfassung

Zytokine spielen eine bedeutende Rolle in der Regulation der Immunantwort und Geweberegeneration. Eine unkontrollierte Zytokinaktivität kann verheerende Auswirkungen in chronischen Entzündungen und während der Karzinogenese haben. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Rolle von IL-22 und dessen endogenem Inhibitor IL-22 Bindeprotein (IL-22BP), der IL-22 bindet und neutralisiert, in der Leberregeneration, -entzündung und Hepatokarzinogenese. Vorarbeiten hatten gezeigt, dass IL-22 eine protektive Rolle nach einem akuten Leberschaden spielen kann. Allerdings sind auch pro-inflammatorische Eigenschaften von IL-22 während einer chronischen Leberentzündung beschrieben worden. Daher vermuten wir, dass IL-22BP ein wichtiger Faktor in der Regulation der dualen Funktion von IL-22 während einer Leberschädigung darstellt. Für eine Untersuchung dieser Hypothese verwendeten wir Il22- und Il22bp- defiziente Mäuse und Mausmodelle für einen akuten Leberschaden, wie das Ischämie-Reperfusionsmodell, die Acetaminophen-induzierte Leberschädigung und die partielle Hepatektomie. Interessanterweise konnten wir zeigen, dass Il22bpeine verstärkte Leberschädigung nach einem Ischämiedefiziente Mäuse Reperfusionsschaden und Acetaminophen-induzierten Leberschaden aufwiesen. Dabei fanden wir heraus, dass IL-22 die Expression des Chemokins CXCL10 in Il22bpdefizienten Mäusen induzieren kann und die Infiltration von pro-inflammatorischen Monozyten in die Leber nach einem Ischämie-Reperfusionsschaden begünstigt. Die Neutralisierung von CXCL10 verminderte wiederum die starke Schädigung der Leber in den Il22bp-defizienten Tieren. Darüber hinaus wurde die Rolle von IL-22 und IL-22BP in einem Leberkarzinommodell untersucht. Vorarbeiten hatten gezeigt, dass IL-22 die Hepatokarzinogenese unterstützen kann. Passend hierzu konnten wir zeigen, dass Il22-defiziente Mäuse tendenziell weniger Lebertumore in dem Mdr2-/- assoziierten Leberkarzinommodell entwickeln. Allerdings scheint IL-22BP in diesem Modell nicht von essentieller Bedeutung zu sein. Weitere Analysen sind jedoch notwendig um den Mechanismus eines Tumor-fördernden Effekts von IL-22 im Mdr2^{-/-} Tiermodell aufzuklären. Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass IL-22 eine duale Funktion in der Leber aufweist und IL-22BP eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von IL-22 spielt.

5.1 Summary

Cytokines play an important role in promoting tissue regeneration. However, uncontrolled cytokine activity is associated with chronic inflammatory diseases, disturbed wound-healing and carcinogenesis. The aim of this work was to study the cytokine IL-22 and IL-22 binding protein (IL-22BP), a soluble endogenous inhibitor of IL-22, in acute liver damage and liver carcinogenesis. Acute liver injury can be secondary to a variety of causes, including infections, intoxication and ischemia. All of these insults induce hepatocyte death and subsequent inflammation, which can make acute liver injury a life-threatening event. IL-22 is a dual natured cytokine which has context-dependent protective and pro-inflammatory properties during tissue damage. Accordingly, IL-22 was shown before to have protective properties during acute liver damage. While other studies suggest pro-inflammatory properties during chronic liver injury. Therefore, we hypothesized that IL-22BP may play a role in regulating protective and pathogenic functions of IL-22 in liver injury. To investigate the role of IL-22BP in acute liver injury, we used Il22bp deficient mice and murine models of acute liver damage induced by partial hepatectomy, ischemia reperfusion and acetaminophen administration. We found that *Il22bp* deficient mice were more susceptible to liver damage after ischemia reperfusion injury and acetaminophen mediated hepatotoxicity. Using an unbiased approach, we found that unopposed IL-22 in Il22bp-deficient mice induced hepatocyte expression of Cxcl10, and increased infiltration of inflammatory CD11b⁺ Ly6C⁺ monocytes into the liver upon ischemia reperfusion induced liver injury. Accordingly, neutralization of Cxcl10 reversed the increased disease susceptibility of *Il22bp* deficient mice. Furthermore, we investigated the role of IL-22 and IL-22BP in hepatocellular carcinoma using Mdr2^{-/-} mice. We found that Il22-deficient mice had by trend a decreased tumor development. In contrast to that IL-22BP did not seem to plays a major role during carcinogenesis in this setting. However further studies are required to investigate the potential pathogenic influence of IL-22 and the role of IL-22BP in liver carcinogenesis. In conclusion, our data suggest that IL-22 has dual functions in the liver, and highlight the important role of IL-22BP in controlling IL-22 activity.

6 Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es die Funktion von IL-22 und IL-22BP nach einer akuten Leberschädigung und während der Hepatokarzinogenese zu untersuchen. Zusammenfassend belegen unsere Ergebnisse, dass IL-22 eine duale Funktion in der Leberregeneration aufweist, und dass IL-22BP eine wichtige Rolle in der Kontrolle von IL-22 spielt. Mechanistisch konnten wir zeigen, dass IL-22, wenn es nicht durch IL-22BP kontrolliert wird, die Expression von CXCL10 aktivieren kann. Allerdings ist die Induktion von CXCL10 durch IL-22 alleine in vitro schwach ausgeprägt²⁰⁸. Daher sollten andere Einflussfaktoren, wie zum Beispiel IFN-a, berücksichtigt und untersucht werden. Des Weiteren sollte der verantwortliche Signalweg, beispielsweise eine STAT3 durch IL-22, untersucht werden. Aktivierung von STAT1 oder Interessanterweise zeigten sowohl IL-22 als auch IL-22BP einen erhöhten Schaden nach Acetaminophen Gabe. Der zugrunde liegende Mechanismus scheint jedoch unabhängig von CXCL10 zu sein und konnte in dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden. Folglich müssten weitere Untersuchungen der dualen Funktion von IL-22 nach einem Acetaminophen-induzierten Leberschaden erfolgen. Potentielle Mechanismen wären gesteigerte Cytochromexpression und eine eine entsprechend zunehmende Metabolisierung von Acetaminophen zu einem toxischen Zwischenprodukt. Um dies zu testen, sollte eine erneute Expressionsanalyse von Cyp2el zu weiteren Zeitpunkten durchgeführt werden. Darüber hinaus könnte ein möglicher Einfluss von IL-22 auf die Metabolisierung von Acetaminophen durch die Quantifizierung der Protein-Addukte geklärt werden. Ein Anstieg dieser Protein-Addukte kann ein Hinweis auf eine vermehrte Entstehung des toxischen Stoffwechselprodukts NAPQI sein¹⁶⁹. Ein zusätzlicher Anhaltspunkt wäre ebenso ein potentieller Einfluss von IL-22 auf den Glutathionstoffwechsel. Ein Glutathionmangel verstärkt die Akkumulation des toxischen Stoffwechselprodukts NAPQI in der Leber. Um dies zu überprüfen, sollte der Glutathiongehalt im Lebergewebe vor und nach Acetaminophen-Behandlung gemessen werden. Ein anderer Aspekt stellt die Rekrutierung von pro-inflammatorischen Immunzellen dar, die ebenso zu einer verstärkten Leberschädigung beitragen könnte. Hierzu sollten verschiedene Zeitpunkte nach der Acetaminophen-Behandlung Diesbezüglich Überprüfung untersucht werden. könnte auch eine der Zytokinzusammensetzung Rückschlüsse auf das inflammatorische Milieu in der Leber geben.

Neben dem Einfluss auf akute Leberschädigungen sind weitere Untersuchungen erforderlich, um die Bedeutung von IL-22 und IL-22BP in der Pathogenese von chronischen Entzündungen und in der Hepatokarzinogenese aufzuklären. Unsere Ergebnisse haben gezeigt, dass in einem Leberkarzinommodell, welches durch eine chronische Entzündung getriggert wird, die Tumorentwicklung durch eine Deletion von 1122 tendenziell vermindert werden kann. Dabei stellt sich die Frage, ob IL-22 die Inflammation in den $Mdr2^{-/-}$ Tieren begünstigen könnte. Es wurde bereits gezeigt, dass IL-22 die Fibroseentwicklung in Zusammenhang mit einer viralen Infektion unterstützten kann^{148,231}. Dementsprechend sollte der Entzündungs- und Fibrosestatus in den verschiedenen Gruppen untersucht werden. Dafür müsste ein histologischer Nachweis und eine Überprüfung der Expression spezifischer Fibrosemarker erfolgen. Die Ursache der verminderten Tumorentwicklung in den $Il22^{-/-}/Mdr2^{-/-}$ Tieren wurde in dieser Arbeit nicht geklärt. Die Proliferationsrate konnte keinen Aufschluss darüber geben, ob IL-22 eine mitogene und anti-apoptotische Wirkung in den Mdr2^{-/-} Tieren aufweist. Aufgrund dessen müssen weitere Analysen wie eine veränderte STAT3 Aktivierung im Lebergewebe oder ein Nachweis einer verstärkten DNA-Schädigung durchgeführt werden. Der inflammatorische Einfluss sowie Fibrose fördernde Effekte durch IL-22 könnten ebenso zur Karzinogenese beitragen. Eine Deletion von Il22bp hatte keinen Einfluss auf die Tumorentwicklung in den $Mdr2^{-/-}$ Tieren. Daher sollte die Funktion von IL-22BP in weiteren Modellen der Hepatokarzinogenese analysiert werden.

7 Literaturverzeichnis

- 1. Kuntz, E. & Kuntz, H.-D. *Hepatology : principles and practice : history, morphology, biochemistry, diagnostics, clinic, therapy*, (Springer, Berlin ; New York, 2002).
- 2. Parker, G.A. & Picut, C.A. Immune functioning in non lymphoid organs: the liver. *Toxicologic pathology* **40**, 237-247 (2012).
- 3. Tabibian, J.H., Masyuk, A.I., Masyuk, T.V., O'Hara, S.P. & LaRusso, N.F. Physiology of cholangiocytes. *Comprehensive Physiology* **3**, 541-565 (2013).
- 4. Braet, F. & Wisse, E. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comparative hepatology* **1**, 1 (2002).
- 5. Hautekeete, M.L. & Geerts, A. The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* **430**, 195-207 (1997).
- 6. Michalopoulos, G.K. Liver regeneration. *Journal of cellular physiology* **213**, 286-300 (2007).
- 7. Fausto, N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* **39**, 1477-1487 (2004).
- 8. Wack, K.E., *et al.* Sinusoidal ultrastructure evaluated during the revascularization of regenerating rat liver. *Hepatology* **33**, 363-378 (2001).
- 9. Kountouras, J., Boura, P. & Lygidakis, N.J. Liver regeneration after hepatectomy. *Hepato-gastroenterology* **48**, 556-562 (2001).
- 10. Cornell, R.P., Liljequist, B.L. & Bartizal, K.F. Depressed liver regeneration after partial hepatectomy of germ-free, athymic and lipopolysaccharide-resistant mice. *Hepatology* **11**, 916-922 (1990).
- 11. Fujiyoshi, M. & Ozaki, M. Molecular mechanisms of liver regeneration and protection for treatment of liver dysfunction and diseases. *Journal of hepatobiliary-pancreatic sciences* **18**, 13-22 (2011).
- 12. Abshagen, K., Eipel, C., Kalff, J.C., Menger, M.D. & Vollmar, B. Loss of NFkappaB activation in Kupffer cell-depleted mice impairs liver regeneration after partial hepatectomy. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **292**, G1570-1577 (2007).
- 13. Schmidt-Arras, D. & Rose-John, S. IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *Journal of hepatology* **64**, 1403-1415 (2016).
- 14. Li, W., Liang, X., Kellendonk, C., Poli, V. & Taub, R. STAT3 contributes to the mitogenic response of hepatocytes during liver regeneration. *The Journal of biological chemistry* **277**, 28411-28417 (2002).
- 15. Kovalovich, K., *et al.* Interleukin-6 protects against Fas-mediated death by establishing a critical level of anti-apoptotic hepatic proteins FLIP, Bcl-2, and Bcl-xL. *The Journal of biological chemistry* **276**, 26605-26613 (2001).
- 16. Olsen, P.S., Poulsen, S.S. & Kirkegaard, P. Adrenergic effects on secretion of epidermal growth factor from Brunner's glands. *Gut* **26**, 920-927 (1985).
- Kim, T.H., Mars, W.M., Stolz, D.B., Petersen, B.E. & Michalopoulos, G.K. Extracellular matrix remodeling at the early stages of liver regeneration in the rat. *Hepatology* 26, 896-904 (1997).
- 18. Perez, M.J. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World Journal of Gastroenterology* **15**, 1677 (2009).
- 19. Huang, W., *et al.* Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. *Science* **312**, 233-236 (2006).
- 20. van de Laarschot, L.F., Jansen, P.L., Schaap, F.G. & Olde Damink, S.W. The

role of bile salts in liver regeneration. *Hepatology international* **10**, 733-740 (2016).

- 21. Zimmermann, A. Regulation of liver regeneration. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association European Renal Association* **19 Suppl 4**, iv6-10 (2004).
- 22. Chen, H., *et al.* Mir-34a is upregulated during liver regeneration in rats and is associated with the suppression of hepatocyte proliferation. *PloS one* **6**, e20238 (2011).
- 23. Naugler, W.E., *et al.* Fibroblast Growth Factor Signaling Controls Liver Size in Mice With Humanized Livers. *Gastroenterology* **149**, 728-740 e715 (2015).
- 24. Taub, R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nature reviews. Molecular cell biology* **5**, 836-847 (2004).
- 25. El-Serag, H.B. Hepatocellular carcinoma. *The New England journal of medicine* **365**, 1118-1127 (2011).
- 26. El-Serag, H.B. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **142**, 1264-1273 e1261 (2012).
- 27. Wolf, M.J., *et al.* Metabolic activation of intrahepatic CD8+ T cells and NKT cells causes nonalcoholic steatohepatitis and liver cancer via cross-talk with hepatocytes. *Cancer cell* **26**, 549-564 (2014).
- De Minicis, S., Day, C. & Svegliati-Baroni, G. From NAFLD to NASH and HCC: pathogenetic mechanisms and therapeutic insights. *Current pharmaceutical design* 19, 5239-5249 (2013).
- 29. Kowdley, K.V. Iron, hemochromatosis, and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **127**, S79-S86 (2004).
- 30. Topic, A., Ljujic, M. & Radojkovic, D. Alpha-1-antitrypsin in pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Hepatitis monthly* **12**, e7042 (2012).
- 31. Farazi, P.A. & DePinho, R.A. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nature reviews. Cancer* **6**, 674-687 (2006).
- 32. Ishizaki, Y., *et al.* Immunohistochemical analysis and mutational analyses of beta-catenin, Axin family and APC genes in hepatocellular carcinomas. *International journal of oncology* **24**, 1077-1083 (2004).
- Li, H.G., et al. PIK3CA polymorphisms associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma. International journal of clinical and experimental pathology 8, 15255-15259 (2015).
- 34. Hussain, S.P., Schwank, J., Staib, F., Wang, X.W. & Harris, C.C. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene* **26**, 2166-2176 (2007).
- 35. Vilchez, V., Turcios, L., Marti, F. & Gedaly, R. Targeting Wnt/beta-catenin pathway in hepatocellular carcinoma treatment. *World J Gastroenterol* **22**, 823-832 (2016).
- 36. Zheng, X., *et al.* Role of the Hedgehog pathway in hepatocellular carcinoma (review). *Oncology reports* **30**, 2020-2026 (2013).
- 37. Cheng, A.L., *et al.* Efficacy and safety of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma according to baseline status: subset analyses of the phase III Sorafenib Asia-Pacific trial. *European journal of cancer* **48**, 1452-1465 (2012).
- 38. Llovet, J.M., *et al.* Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *The New England journal of medicine* **359**, 378-390 (2008).
- 39. Forner, A., Llovet, J.M. & Bruix, J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* **379**, 1245-1255 (2012).
- 40. Elvington, M., Liszewski, M.K. & Atkinson, J.P. Evolution of the complement system: from defense of the single cell to guardian of the intravascular space.

Immunological reviews 274, 9-15 (2016).

- 41. Erhardt, A. & Tiegs, G. Tolerance induction in response to liver inflammation. *Digestive diseases* **28**, 86-92 (2010).
- 42. Biswas, S.K. & Lopez-Collazo, E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends in immunology* **30**, 475-487 (2009).
- 43. Protzer, U., Maini, M.K. & Knolle, P.A. Living in the liver: hepatic infections. *Nature reviews. Immunology* **12**, 201-213 (2012).
- 44. Thomson, A.W. & Knolle, P.A. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nature reviews. Immunology* **10**, 753-766 (2010).
- 45. Mengshol, J.A., *et al.* A crucial role for Kupffer cell-derived galectin-9 in regulation of T cell immunity in hepatitis C infection. *PloS one* **5**, e9504 (2010).
- 46. Hsieh, C.C., Hung, C.H., Lu, L. & Qian, S. Hepatic immune tolerance induced by hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* **21**, 11887-11892 (2015).
- 47. Bamboat, Z.M., *et al.* Human liver dendritic cells promote T cell hyporesponsiveness. *Journal of immunology* **182**, 1901-1911 (2009).
- Limmer, A., et al. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. Nature medicine 6, 1348-1354 (2000).
- 49. Iwai, Y., Terawaki, S., Ikegawa, M., Okazaki, T. & Honjo, T. PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver. *The Journal of experimental medicine* **198**, 39-50 (2003).
- 50. Isogawa, M., Furuichi, Y. & Chisari, F.V. Oscillating CD8(+) T cell effector functions after antigen recognition in the liver. *Immunity* **23**, 53-63 (2005).
- 51. Naito, M., Hasegawa, G., Ebe, Y. & Yamamoto, T. Differentiation and function of Kupffer cells. *Medical electron microscopy : official journal of the Clinical Electron Microscopy Society of Japan* **37**, 16-28 (2004).
- 52. Rahman, A.H. & Aloman, C. Dendritic cells and liver fibrosis. *Biochimica et biophysica acta* **1832**, 998-1004 (2013).
- 53. Kolaczkowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews. Immunology* **13**, 159-175 (2013).
- 54. Gujral, J.S., Farhood, A., Bajt, M.L. & Jaeschke, H. Neutrophils aggravate acute liver injury during obstructive cholestasis in bile duct-ligated mice. *Hepatology* **38**, 355-363 (2003).
- 55. Hager, M., Cowland, J.B. & Borregaard, N. Neutrophil granules in health and disease. *Journal of internal medicine* **268**, 25-34 (2010).
- 56. Robinson, J.M. Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochemistry and cell biology* **130**, 281-297 (2008).
- 57. Brinkmann, V., et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science 303, 1532-1535 (2004).
- 58. Ramaiah, S.K. & Jaeschke, H. Role of neutrophils in the pathogenesis of acute inflammatory liver injury. *Toxicologic pathology* **35**, 757-766 (2007).
- 59. Tian, Z., Chen, Y. & Gao, B. Natural killer cells in liver disease. *Hepatology* **57**, 1654-1662 (2013).
- 60. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. Functions of natural killer cells. *Nature immunology* **9**, 503-510 (2008).
- 61. Wang, R., Jaw, J.J., Stutzman, N.C., Zou, Z. & Sun, P.D. Natural killer cellproduced IFN-gamma and TNF-alpha induce target cell cytolysis through upregulation of ICAM-1. *Journal of leukocyte biology* **91**, 299-309 (2012).
- 62. 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* **130**, 435-452 (2006).
- 63. Ahlenstiel, G., Martin, M.P., Gao, X., Carrington, M. & Rehermann, B. Distinct

KIR/HLA compound genotypes affect the kinetics of human antiviral natural killer cell responses. *The Journal of clinical investigation* **118**, 1017-1026 (2008).

- 64. Kumar, V. & McNerney, M.E. A new self: MHC-class-I-independent natural-killercell self-tolerance. *Nature reviews. Immunology* **5**, 363-374 (2005).
- 65. Wu, Z., Han, M., Chen, T., Yan, W. & Ning, Q. Acute liver failure: mechanisms of immune-mediated liver injury. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* **30**, 782-794 (2010).
- 66. Doherty, D.G. & O'Farrelly, C. Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunological reviews* **174**, 5-20 (2000).
- 67. Gao, G.F. & Jakobsen, B.K. Molecular interactions of coreceptor CD8 and MHC class I: the molecular basis for functional coordination with the T-cell receptor. *Immunology today* **21**, 630-636 (2000).
- 68. Gay, D., *et al.* Functional interaction between human T-cell protein CD4 and the major histocompatibility complex HLA-DR antigen. *Nature* **328**, 626-629 (1987).
- 69. Alegre, M.L., Frauwirth, K.A. & Thompson, C.B. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nature reviews. Immunology* **1**, 220-228 (2001).
- 70. Racanelli, V. & Rehermann, B. The liver as an immunological organ. *Hepatology* **43**, S54-62 (2006).
- 71. Andersen, M.H., Schrama, D., Thor Straten, P. & Becker, J.C. Cytotoxic T cells. *The Journal of investigative dermatology* **126**, 32-41 (2006).
- 72. Liao, C.M., Zimmer, M.I. & Wang, C.R. The functions of type I and type II natural killer T cells in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory bowel diseases* **19**, 1330-1338 (2013).
- 73. Smyth, M.J., *et al.* Activation of NK cell cytotoxicity. *Molecular immunology* **42**, 501-510 (2005).
- 74. Bluestone, J.A., Mackay, C.R., O'Shea, J.J. & Stockinger, B. The functional plasticity of T cell subsets. *Nature reviews. Immunology* **9**, 811-816 (2009).
- 75. Kawakami, K. & Parker, D.C. Differences between T helper cell type I (Th1) and Th2 cell lines in signalling pathways for induction of contact-dependent T cell help. *European journal of immunology* **22**, 85-93 (1992).
- 76. Paul, W.E. & Zhu, J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nature reviews. Immunology* **10**, 225-235 (2010).
- 77. Crotty, S. A brief history of T cell help to B cells. *Nature reviews. Immunology* **15**, 185-189 (2015).
- 78. Harrington, L.E., *et al.* Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature immunology* **6**, 1123-1132 (2005).
- 79. Pelletier, M., *et al.* Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood* **115**, 335-343 (2010).
- 80. Zheng, Y., *et al.* Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* **445**, 648-651 (2007).
- Trifari, S., Kaplan, C.D., Tran, E.H., Crellin, N.K. & Spits, H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nature immunology* 10, 864-871 (2009).
- 82. Breous, E., Somanathan, S., Vandenberghe, L.H. & Wilson, J.M. Hepatic regulatory T cells and Kupffer cells are crucial mediators of systemic T cell tolerance to antigens targeting murine liver. *Hepatology* **50**, 612-621 (2009).
- Xu, L., Yin, W., Sun, R., Wei, H. & Tian, Z. Liver type I regulatory T cells suppress germinal center formation in HBV-tolerant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 16993-16998 (2013).

- 84. Sakaguchi, S., Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P. & Yamaguchi, T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *International immunology* **21**, 1105-1111 (2009).
- 85. Hammerich, L. & Tacke, F. Role of gamma-delta T cells in liver inflammation and fibrosis. *World journal of gastrointestinal pathophysiology* **5**, 107-113 (2014).
- 86. Hayday, A.C. [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annual review of immunology* **18**, 975-1026 (2000).
- 87. Chien, Y.H. & Konigshofer, Y. Antigen recognition by gammadelta T cells. *Immunological reviews* **215**, 46-58 (2007).
- 88. Huber, S., Shi, C. & Budd, R.C. Gammadelta T cells promote a Th1 response during coxsackievirus B3 infection in vivo: role of Fas and Fas ligand. *Journal of virology* **76**, 6487-6494 (2002).
- Farouk, S.E., Mincheva-Nilsson, L., Krensky, A.M., Dieli, F. & Troye-Blomberg, M. Gamma delta T cells inhibit in vitro growth of the asexual blood stages of Plasmodium falciparum by a granule exocytosis-dependent cytotoxic pathway that requires granulysin. *European journal of immunology* 34, 2248-2256 (2004).
- 90. Lafont, V., et al. Plasticity of gammadelta T Cells: Impact on the Anti-Tumor Response. *Frontiers in immunology* **5**, 622 (2014).
- 91. Pestka, S., et al. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. Annual review of immunology **22**, 929-979 (2004).
- 92. Wolk, K., et al. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* **21**, 241-254 (2004).
- 93. Nagem, R.A., *et al.* Crystal structure of recombinant human interleukin-22. *Structure* **10**, 1051-1062 (2002).
- 94. Sabat, R., Ouyang, W. & Wolk, K. Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system. *Nature reviews. Drug discovery* **13**, 21-38 (2014).
- 95. Liang, S.C., *et al.* Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *The Journal of experimental medicine* **203**, 2271-2279 (2006).
- Witte, E., Witte, K., Warszawska, K., Sabat, R. & Wolk, K. Interleukin-22: A cytokine produced by T, NK and NKT cell subsets, with importance in the innate immune defense and tissue protection. *Cytokine & growth factor reviews* **21**, 365-379 (2010).
- Satoh-Takayama, N., *et al.* Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity* 29, 958-970 (2008).
- 98. Sonnenberg, G.F., Monticelli, L.A., Elloso, M.M., Fouser, L.A. & Artis, D. CD4(+) lymphoid tissue-inducer cells promote innate immunity in the gut. *Immunity* **34**, 122-134 (2011).
- 99. Basu, R., *et al.* Th22 cells are an important source of IL-22 for host protection against enteropathogenic bacteria. *Immunity* **37**, 1061-1075 (2012).
- 100. Zindl, C.L., *et al.* IL-22-producing neutrophils contribute to antimicrobial defense and restitution of colonic epithelial integrity during colitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 12768-12773 (2013).
- 101. Ikeuchi, H., *et al.* Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis and rheumatism* **52**, 1037-1046 (2005).
- 102. Mabuchi, T., Takekoshi, T. & Hwang, S.T. Epidermal CCR6+ gammadelta T cells are major producers of IL-22 and IL-17 in a murine model of psoriasiform dermatitis. *Journal of immunology* **187**, 5026-5031 (2011).
- 103. Lee, J.S., et al. AHR drives the development of gut ILC22 cells and postnatal

lymphoid tissues via pathways dependent on and independent of Notch. *Nature immunology* **13**, 144-151 (2011).

- 104. Sawa, S., *et al.* RORgammat+ innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. *Nature immunology* **12**, 320-326 (2011).
- Backert, I., *et al.* STAT3 activation in Th17 and Th22 cells controls IL-22mediated epithelial host defense during infectious colitis. *Journal of immunology* **193**, 3779-3791 (2014).
- 106. Xu, M., *et al.* Regulation of the development of acute hepatitis by IL-23 through IL-22 and IL-17 production. *European journal of immunology* **41**, 2828-2839 (2011).
- 107. Kotenko, S.V., et al. Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. The Journal of biological chemistry **276**, 2725-2732 (2001).
- 108. Xie, M.H., *et al.* Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. *The Journal of biological chemistry* **275**, 31335-31339 (2000).
- 109. Jones, B.C., Logsdon, N.J. & Walter, M.R. Structure of IL-22 bound to its highaffinity IL-22R1 chain. *Structure* **16**, 1333-1344 (2008).
- Bleicher, L., *et al.* Crystal structure of the IL-22/IL-22R1 complex and its implications for the IL-22 signaling mechanism. *FEBS letters* 582, 2985-2992 (2008).
- 111. Yoon, S.I., *et al.* Structure and mechanism of receptor sharing by the IL-10R2 common chain. *Structure* **18**, 638-648 (2010).
- 112. Logsdon, N.J., *et al.* The IL-10R2 binding hot spot on IL-22 is located on the N-terminal helix and is dependent on N-linked glycosylation. *Journal of molecular biology* **342**, 503-514 (2004).
- 113. Kotenko, S.V., *et al.* Identification, Cloning, and Characterization of a Novel Soluble Receptor That Binds IL-22 and Neutralizes Its Activity. *The Journal of Immunology* **166**, 7096-7103 (2001).
- 114. Dumoutier, L., Lejeune, D., Colau, D. & Renauld, J.C. Cloning and Characterization of IL-22 Binding Protein, a Natural Antagonist of IL-10-Related T Cell-Derived Inducible Factor/IL-22. *The Journal of Immunology* **166**, 7090-7095 (2001).
- Wei, C.C., Ho, T.W., Liang, W.G., Chen, G.Y. & Chang, M.S. Cloning and characterization of mouse IL-22 binding protein. *Genes and immunity* 4, 204-211 (2003).
- 116. de Moura, P.R., *et al.* Crystal structure of a soluble decoy receptor IL-22BP bound to interleukin-22. *FEBS letters* **583**, 1072-1077 (2009).
- 117. Xu, W., et al. A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**, 9511-9516 (2001).
- 118. Lejeune, D., *et al.* Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10. *The Journal of biological chemistry* **277**, 33676-33682 (2002).
- 119. Dumoutier, L., de Meester, C., Tavernier, J. & Renauld, J.C. New activation modus of STAT3: a tyrosine-less region of the interleukin-22 receptor recruits STAT3 by interacting with its coiled-coil domain. *The Journal of biological chemistry* **284**, 26377-26384 (2009).
- 120. Dumoutier, L., Van Roost, E., Colau, D. & Renauld, J.C. Human interleukin-10-

related T cell-derived inducible factor: molecular cloning and functional characterization as an hepatocyte-stimulating factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 10144-10149 (2000).

- Dumoutier, L., Louahed, J. & Renauld, J.C. Cloning and characterization of IL-10related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9. *Journal of immunology* **164**, 1814-1819 (2000).
- Żhu, X., et al. Participation of Gab1 and Gab2 in IL-22-mediated keratinocyte proliferation, migration, and differentiation. *Molecular and cellular biochemistry* 369, 255-266 (2012).
- Andoh, A., et al. Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology* 129, 969-984 (2005).
- 124. Mitra, A., Raychaudhuri, S.K. & Raychaudhuri, S.P. IL-22 induced cell proliferation is regulated by PI3K/Akt/mTOR signaling cascade. *Cytokine* **60**, 38-42 (2012).
- 125. Pennino, D., *et al.* IL-22 suppresses IFN-gamma-mediated lung inflammation in asthmatic patients. *The Journal of allergy and clinical immunology* **131**, 562-570 (2013).
- 126. Zheng, Y., *et al.* Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nature medicine* **14**, 282-289 (2008).
- 127. Dudakov, J.A., *et al.* Interleukin-22 drives endogenous thymic regeneration in mice. *Science* **336**, 91-95 (2012).
- 128. Wolk, K., *et al.* IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-gamma are not. *Journal of molecular medicine* **87**, 523-536 (2009).
- 129. Wolk, K., *et al.* IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *European journal of immunology* **36**, 1309-1323 (2006).
- Boniface, K., et al. IL-22 Inhibits Epidermal Differentiation and Induces Proinflammatory Gene Expression and Migration of Human Keratinocytes. The Journal of Immunology 174, 3695-3702 (2005).
- 131. Sonnenberg, G.F., Fouser, L.A. & Artis, D. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nature immunology* **12**, 383-390 (2011).
- 132. Sugimoto, K., *et al.* IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *The Journal of clinical investigation* **118**, 534-544 (2008).
- Guilloteau, K., et al. Skin Inflammation Induced by the Synergistic Action of IL-17A, IL-22, Oncostatin M, IL-1{alpha}, and TNF-{alpha} Recapitulates Some Features of Psoriasis. Journal of immunology (2010).
- 134. Dixon, B.R., Radin, J.N., Piazuelo, M.B., Contreras, D.C. & Algood, H.M. IL-17a and IL-22 Induce Expression of Antimicrobials in Gastrointestinal Epithelial Cells and May Contribute to Epithelial Cell Defense against Helicobacter pylori. *PloS* one **11**, e0148514 (2016).
- 135. Kirchberger, S., *et al.* Innate lymphoid cells sustain colon cancer through production of interleukin-22 in a mouse model. *The Journal of experimental medicine* **210**, 917-931 (2013).
- 136. Huber, S., *et al.* IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature* **491**, 259-263 (2012).
- 137. Feng, D., *et al.* Interleukin-22 promotes proliferation of liver stem/progenitor cells in mice and patients with chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology*

143, 188-198 e187 (2012).

- 138. Liang, S.C., et al. IL-22 induces an acute-phase response. Journal of immunology **185**, 5531-5538 (2010).
- Radaeva, S., Sun, R., Pan, H.N., Hong, F. & Gao, B. Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation. *Hepatology* **39**, 1332-1342 (2004).
- Park, O., *et al.* In vivo consequences of liver-specific interleukin-22 expression in mice: Implications for human liver disease progression. *Hepatology* 54, 252-261 (2011).
- 141. Ki, S.H., *et al.* Interleukin-22 treatment ameliorates alcoholic liver injury in a murine model of chronic-binge ethanol feeding: role of signal transducer and activator of transcription 3. *Hepatology* **52**, 1291-1300 (2010).
- 142. Kong, X., Feng, D., Mathews, S. & Gao, B. Hepatoprotective and anti-fibrotic functions of interleukin-22: therapeutic potential for the treatment of alcoholic liver disease. *Journal of gastroenterology and hepatology* **28 Suppl 1**, 56-60 (2013).
- 143. Kong, X., *et al.* Interleukin-22 induces hepatic stellate cell senescence and restricts liver fibrosis in mice. *Hepatology* **56**, 1150-1159 (2012).
- 144. Zenewicz, L.A., *et al.* Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity* **27**, 647-659 (2007).
- 145. Xing, W.W., *et al.* Interleukin-22 protects against acute alcohol-induced hepatotoxicity in mice. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **75**, 1290-1294 (2011).
- 146. Pan, H., Hong, F., Radaeva, S. & Gao, B. Hydrodynamic gene delivery of interleukin-22 protects the mouse liver from concanavalin A-, carbon tetrachloride-, and Fas ligand-induced injury via activation of STAT3. *Cellular & molecular immunology* 1, 43-49 (2004).
- 147. Jiang, R., *et al.* Interleukin-22 promotes human hepatocellular carcinoma by activation of STAT3. *Hepatology* **54**, 900-909 (2011).
- Zhao, J., et al. Pathological functions of interleukin-22 in chronic liver inflammation and fibrosis with hepatitis B virus infection by promoting T helper 17 cell recruitment. *Hepatology* 59, 1331-1342 (2014).
- 149. Wu, P.W., *et al.* IL-22R, IL-10R2, and IL-22BP binding sites are topologically juxtaposed on adjacent and overlapping surfaces of IL-22. *Journal of molecular biology* **382**, 1168-1183 (2008).
- 150. Dumoutier, L., Leemans, C., Lejeune, D., Kotenko, S.V. & Renauld, J.C. Cutting Edge: STAT Activation By IL-19, IL-20 and mda-7 Through IL-20 Receptor Complexes of Two Types. *The Journal of Immunology* **167**, 3545-3549 (2001).
- 151. Dudakov, J.A., Hanash, A.M. & van den Brink, M.R. Interleukin-22: immunobiology and pathology. *Annual review of immunology* **33**, 747-785 (2015).
- 152. Lim, C., Hong, M. & Savan, R. Human IL-22 binding protein isoforms act as a rheostat for IL-22 signaling. *Science signaling* **9**, ra95 (2016).
- 153. Pelczar, P., *et al.* A pathogenic role for T cell–derived IL-22BP in inflammatory bowel disease. *Science* **354**, 358-362 (2016).
- 154. Martin, J.C., *et al.* IL-22BP is produced by eosinophils in human gut and blocks IL-22 protective actions during colitis. *Mucosal immunology* **9**, 539-549 (2016).
- Sertorio, M., et al. IL-22 and IL-22 binding protein (IL-22BP) regulate fibrosis and cirrhosis in hepatitis C virus and schistosome infections. *Hepatology* 61, 1321-1331 (2015).
- 156. Wilson, M.S., *et al.* Redundant and pathogenic roles for IL-22 in mycobacterial, protozoan, and helminth infections. *Journal of immunology* **184**, 4378-4390 (2010).
- 157. Trivella, D.B., Ferreira-Junior, J.R., Dumoutier, L., Renauld, J.C. & Polikarpov, I.

Structure and function of interleukin-22 and other members of the interleukin-10 family. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **67**, 2909-2935 (2010).

- 158. Zhai, Y., Petrowsky, H., Hong, J.C., Busuttil, R.W. & Kupiec-Weglinski, J.W. Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation--from bench to bedside. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* **10**, 79-89 (2013).
- Kalogeris, T., Baines, C.P., Krenz, M. & Korthuis, R.J. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *International review of cell and molecular biology* 298, 229-317 (2012).
- 160. Teoh, N.C. & Farrell, G.C. Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *Journal of gastroenterology and hepatology* **18**, 891-902 (2003).
- 161. Kupiec-Weglinski, J.W. & Busuttil, R.W. Ischemia and reperfusion injury in liver transplantation. *Transplantation proceedings* **37**, 1653-1656 (2005).
- Fondevila, C., Busuttil, R.W. & Kupiec-Weglinski, J.W. Hepatic ischemia/reperfusion injury--a fresh look. *Experimental and molecular pathology* 74, 86-93 (2003).
- 163. Arii, S., Teramoto, K. & Kawamura, T. Current progress in the understanding of and therapeutic strategies for ischemia and reperfusion injury of the liver. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery* **10**, 189-194 (2003).
- Tapuria, N., *et al.* Effect of remote ischemic preconditioning on hepatic microcirculation and function in a rat model of hepatic ischemia reperfusion injury. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* **11**, 108-117 (2009).
- 165. Uhlmann, D., *et al.* Improvement of postischemic hepatic microcirculation after endothelinA receptor blockade--endothelin antagonism influences plateletendothelium interactions. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* **9**, 187-197 (2005).
- 166. Abe, Y., et al. Mouse model of liver ischemia and reperfusion injury: method for studying reactive oxygen and nitrogen metabolites in vivo. Free radical biology & medicine 46, 1-7 (2009).
- 167. Hinz, B., Cheremina, O. & Brune, K. Acetaminophen (paracetamol) is a selective cyclooxygenase-2 inhibitor in man. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **22**, 383-390 (2008).
- 168. Kane, R.E., Li, A.P. & Kaminski, D.R. Sulfation and glucuronidation of acetaminophen by human hepatocytes cultured on Matrigel and type 1 collagen reproduces conjugation in vivo. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **23**, 303-307 (1995).
- 169. Feng, D., et al. Acute and chronic effects of IL-22 on acetaminophen-induced liver injury. *Journal of immunology* **193**, 2512-2518 (2014).
- Krenkel, O., Mossanen, J.C. & Tacke, F. Immune mechanisms in acetaminophen-induced acute liver failure. *Hepatobiliary surgery and nutrition* 3, 331-343 (2014).
- 171. Yamanaka, N., *et al.* Dynamics of normal and injured human liver regeneration after hepatectomy as assessed on the basis of computed tomography and liver function. *Hepatology* **18**, 79-85 (1993).
- 172. Michalopoulos, G.K. & DeFrances, M.C. Liver regeneration. *Science* **276**, 60-66 (1997).
- 173. Greene, A.K. & Puder, M. Partial hepatectomy in the mouse: technique and perioperative management. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research* **16**, 99-102 (2003).
- 174. Mauad, T.H., *et al.* Mice with homozygous disruption of the mdr2 P-glycoprotein gene. A novel animal model for studies of nonsuppurative inflammatory

cholangitis and hepatocarcinogenesis. *The American journal of pathology* **145**, 1237-1245 (1994).

- Popov, Y., Patsenker, E., Fickert, P., Trauner, M. & Schuppan, D. Mdr2 (Abcb4)-/- mice spontaneously develop severe biliary fibrosis via massive dysregulation of pro- and antifibrogenic genes. *Journal of hepatology* 43, 1045-1054 (2005).
- Fickert, P., *et al.* Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. *Gastroenterology* 127, 261-274 (2004).
- 177. Katzenellenbogen, M., *et al.* Molecular mechanisms of liver carcinogenesis in the mdr2-knockout mice. *Molecular cancer research : MCR* **5**, 1159-1170 (2007).
- 178. Wan, Y.Y. & Flavell, R.A. Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 5126-5131 (2005).
- 179. Zhai, Y., *et al.* CXCL10 regulates liver innate immune response against ischemia and reperfusion injury. *Hepatology* **47**, 207-214 (2008).
- van Nieuwerk, C.M., et al. The role of bile salt composition in liver pathology of mdr2 (-/-) mice: differences between males and females. *Journal of hepatology* 26, 138-145 (1997).
- 181. Yang, L., *et al.* Amelioration of high fat diet induced liver lipogenesis and hepatic steatosis by interleukin-22. *Journal of hepatology* **53**, 339-347 (2010).
- Rolla, S., *et al.* The balance between IL-17 and IL-22 produced by liver-infiltrating T-helper cells critically controls NASH development in mice. *Clinical science* 130, 193-203 (2016).
- 183. Zhang, L., *et al.* Elevated Th22 cells correlated with Th17 cells in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of clinical immunology* **31**, 606-614 (2011).
- Kamanaka, M., et al. Memory/effector (CD45RB(Io)) CD4 T cells are controlled directly by IL-10 and cause IL-22-dependent intestinal pathology. *The Journal of* experimental medicine 208, 1027-1040 (2011).
- 185. Zhang, Y., *et al.* A proinflammatory role for interleukin-22 in the immune response to hepatitis B virus. *Gastroenterology* **141**, 1897-1906 (2011).
- 186. Kronenberger, B., *et al.* Interleukin-22 predicts severity and death in advanced liver cirrhosis: a prospective cohort study. *BMC medicine* **10**, 102 (2012).
- Kinnebrew, M.A., et al. Interleukin 23 production by intestinal CD103(+)CD11b(+) dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense. *Immunity* 36, 276-287 (2012).
- 188. Tachiiri, A., *et al.* Genomic structure and inducible expression of the IL-22 receptor alpha chain in mice. *Genes and immunity* **4**, 153-159 (2003).
- 189. Mizoguchi, A. Healing of intestinal inflammation by IL-22. *Inflammatory bowel diseases* **18**, 1777-1784 (2012).
- Pickert, G., et al. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *The Journal of experimental medicine* 206, 1465-1472 (2009).
- Ren, X., Hu, B. & Colletti, L.M. IL-22 is involved in liver regeneration after hepatectomy. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 298, G74-80 (2010).
- 192. Chestovich, P.J., *et al.* Interleukin-22: implications for liver ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* **93**, 485-492 (2012).
- 193. Guabiraba, R., *et al.* IL-22 modulates IL-17A production and controls inflammation and tissue damage in experimental dengue infection. *European journal of immunology* **43**, 1529-1544 (2013).
- 194. Kudira, R., *et al.* P2X1-regulated IL-22 secretion by innate lymphoid cells is required for efficient liver regeneration. *Hepatology* **63**, 2004-2017 (2016).

- 195. Mastelic, B., *et al.* IL-22 Protects Against Liver Pathology and Lethality of an Experimental Blood-Stage Malaria Infection. *Frontiers in immunology* **3**, 85 (2012).
- 196. Eggenhofer, E., *et al.* RORgammat(+) IL-22-producing NKp46(+) cells protect from hepatic ischemia reperfusion injury in mice. *Journal of hepatology* **64**, 128-134 (2016).
- 197. Sanos, S.L., *et al.* RORgammat and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells. *Nature immunology* **10**, 83-91 (2009).
- 198. Zhai, Y., Busuttil, R.W. & Kupiec-Weglinski, J.W. Liver ischemia and reperfusion injury: new insights into mechanisms of innate-adaptive immune-mediated tissue inflammation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **11**, 1563-1569 (2011).
- 199. Zimmermann, H.W., Trautwein, C. & Tacke, F. Functional role of monocytes and macrophages for the inflammatory response in acute liver injury. *Frontiers in physiology* **3**, 56 (2012).
- Bamboat, Z.M., *et al.* Conventional DCs reduce liver ischemia/reperfusion injury in mice via IL-10 secretion. *The Journal of clinical investigation* **120**, 559-569 (2010).
- 201. Castellaneta, A., *et al.* Plasmacytoid dendritic cell-derived IFN-alpha promotes murine liver ischemia/reperfusion injury by induction of hepatocyte IRF-1. *Hepatology* **60**, 267-277 (2014).
- Zhang, M., et al. Roles of dendritic cells in murine hepatic warm and liver transplantation-induced cold ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 57, 1585-1596 (2013).
- Nishioji, K., *et al.* Increase of chemokine interferon-inducible protein-10 (IP-10) in the serum of patients with autoimmune liver diseases and increase of its mRNA expression in hepatocytes. *Clinical and experimental immunology* **123**, 271-279 (2001).
- 204. Brownell, J., et al. Independent, parallel pathways to CXCL10 induction in HCVinfected hepatocytes. Journal of hepatology **59**, 701-708 (2013).
- 205. Yoneyama, H., *et al.* Neutralization of CXCL10 accelerates liver regeneration in carbon tetrachloride-induced acute liver injury. *Medical molecular morphology* **40**, 191-197 (2007).
- Ibrahim, S.H., et al. Mixed lineage kinase 3 mediates release of C-X-C motif ligand 10-bearing chemotactic extracellular vesicles from lipotoxic hepatocytes. *Hepatology* 63, 731-744 (2016).
- 207. Petrovic-Djergovic, D., et al. CXCL10 induces the recruitment of monocytederived macrophages into kidney, which aggravate puromycin aminonucleoside nephrosis. *Clinical and experimental immunology* **180**, 305-315 (2015).
- Bachmann, M., Ulziibat, S., Härdle, L., Pfeilschifter, J. & Mühl, H. IFNα converts IL-22 into a cytokine efficiently activating STAT1 and its downstream targets. *Biochemical Pharmacology* 85, 396-403 (2013).
- 209. Muhl, H. Pro-Inflammatory Signaling by IL-10 and IL-22: Bad Habit Stirred Up by Interferons? *Frontiers in immunology* **4**, 18 (2013).
- Scheiermann, P., et al. Application of interleukin-22 mediates protection in experimental acetaminophen-induced acute liver injury. The American journal of pathology 182, 1107-1113 (2013).
- 211. Bone-Larson, C.L., Hogaboam, C.M., Evanhoff, H., Strieter, R.M. & Kunkel, S.L. IFN- -Inducible Protein-10 (CXCL10) Is Hepatoprotective During Acute Liver Injury Through the Induction of CXCR2 on Hepatocytes. *The Journal of*

Immunology 167, 7077-7083 (2001).

- 212. Wang, X., *et al.* Regulatory T cells ameliorate acetaminophen-induced immunemediated liver injury. *International immunopharmacology* **25**, 293-301 (2015).
- 213. Hinson, J.A., Roberts, D.W. & James, L.P. Mechanisms of acetaminopheninduced liver necrosis. *Handbook of experimental pharmacology*, 369-405 (2010).
- Martin-Murphy, B.V., Kominsky, D.J., Orlicky, D.J., Donohue, T.M., Jr. & Ju, C. Increased susceptibility of natural killer T-cell-deficient mice to acetaminopheninduced liver injury. *Hepatology* 57, 1575-1584 (2013).
- 215. Muhl, H. STAT3, a Key Parameter of Cytokine-Driven Tissue Protection during Sterile Inflammation - the Case of Experimental Acetaminophen (Paracetamol)-Induced Liver Damage. *Frontiers in immunology* **7**, 163 (2016).
- Horiguchi, N., *et al.* Dissociation between liver inflammation and hepatocellular damage induced by carbon tetrachloride in myeloid cell-specific signal transducer and activator of transcription 3 gene knockout mice. *Hepatology* **51**, 1724-1734 (2010).
- Horiguchi, N., et al. Cell type-dependent pro- and anti-inflammatory role of signal transducer and activator of transcription 3 in alcoholic liver injury. *Gastroenterology* 134, 1148-1158 (2008).
- 218. Connolly, M.K., *et al.* Dendritic cell depletion exacerbates acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology* **54**, 959-968 (2011).
- 219. Liu, Z.-X., Govindarajan, S. & Kaplowitz, N. Innate immune system plays a critical role in determining the progression and severity of acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology* **127**, 1760-1774 (2004).
- 220. Ishida, Y., *et al.* A pivotal involvement of IFN-gamma in the pathogenesis of acetaminophen-induced acute liver injury. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **16**, 1227-1236 (2002).
- 221. Masson, M.J., Carpenter, L.D., Graf, M.L. & Pohl, L.R. Pathogenic role of natural killer T and natural killer cells in acetaminophen-induced liver injury in mice is dependent on the presence of dimethyl sulfoxide. *Hepatology* **48**, 889-897 (2008).
- 222. Rao, R., *et al.* Interleukin 17-producing gammadeltaT cells promote hepatic regeneration in mice. *Gastroenterology* **147**, 473-484 e472 (2014).
- Pan, C.X., et al. Role of interleukin-22 in liver diseases. Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.] 63, 519-525 (2014).
- 224. Kobold, S., *et al.* Interleukin-22 is frequently expressed in small- and large-cell lung cancer and promotes growth in chemotherapy-resistant cancer cells. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* **8**, 1032-1042 (2013).
- 225. Jiang, R., et al. IL-22 is related to development of human colon cancer by activation of STAT3. BMC cancer **13**, 59 (2013).
- 226. Zhuang, Y., *et al.* Increased intratumoral IL-22-producing CD4(+) T cells and Th22 cells correlate with gastric cancer progression and predict poor patient survival. *Cancer immunology, immunotherapy : Cll* **61**, 1965-1975 (2012).
- 227. Bromberg, J.F., et al. Stat3 as an oncogene. Cell 98, 295-303 (1999).
- Wang, Z., *et al.* High fat diet induces formation of spontaneous liposarcoma in mouse adipose tissue with overexpression of interleukin 22. *PloS one* 6, e23737 (2011).
- 229. Lim, C. & Savan, R. The role of the IL-22/IL-22R1 axis in cancer. *Cytokine & growth factor reviews* **25**, 257-271 (2014).
- 230. Carmo, R.F., Cavalcanti, M.S. & Moura, P. Role of Interleukin-22 in chronic liver

injury. Cytokine (2016).

- Wu, L.-Y., et al. Up-regulation of interleukin-22 mediates liver fibrosis via activating hepatic stellate cells in patients with hepatitis C. *Clinical Immunology* 158, 77-87 (2015).
- 232. Gao, Y., *et al.* Pathological Roles of Interleukin-22 in the Development of Recurrent Hepatitis C after Liver Transplantation. *PloS one* **11**, e0154419 (2016).
- 233. Hu, B.L., *et al.* Interleukin-22 ameliorates liver fibrosis through miR-200a/betacatenin. *Scientific reports* **6**, 36436 (2016).
- Lu, D.H., et al. Interleukin-22 ameliorates liver fibrogenesis by attenuating hepatic stellate cell activation and downregulating the levels of inflammatory cytokines. World J Gastroenterol 21, 1531-1545 (2015).
- 235. Qin, S., *et al.* Th22 cells are associated with hepatocellular carcinoma development and progression. *Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu* **26**, 135-141 (2014).
- 236. Waidmann, O., *et al.* Interleukin-22 serum levels are a negative prognostic indicator in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **59**, 1207 (2014).
- Yang, S.B., Han, F., Wu, J.H., Zhao, Z. & Zhan, W. Association between CXCR2 and IL-22BP expression indicate a poor outcome for gastric adenocarcinoma progression. *Oncology letters* 12, 1477-1484 (2016).
- 238. Ahn, J., Konno, H. & Barber, G.N. Diverse roles of STING-dependent signaling on the development of cancer. *Oncogene* **34**, 5302-5308 (2015).
- 239. Zenewicz, L.A., *et al.* IL-22 deficiency alters colonic microbiota to be transmissible and colitogenic. *Journal of immunology* **190**, 5306-5312 (2013).
- 240. Tao, X., Wang, N. & Qin, W. Gut Microbiota and Hepatocellular Carcinoma. *Gastrointestinal tumors* **2**, 33-40 (2015).
- 241. Dapito, D.H., *et al.* Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4. *Cancer cell* **21**, 504-516 (2012).
- 242. Roderburg, C. & Luedde, T. The role of the gut microbiome in the development and progression of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Gut microbes* **5**, 441-445 (2014).
- 243. Ray, K. Gut microbiota: Obesity-induced microbial metabolite promotes HCC. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* **10**, 442 (2013).
- 244. Shirabe, K., *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes and hepatocellular carcinoma: pathology and clinical management. *International journal of clinical oncology* **15**, 552-558 (2010).
- 245. Eiro, N. & Vizoso, F.J. Importance of tumor/stroma interactions in prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary surgery and nutrition* **3**, 98-101 (2014).
- 246. Mossanen, J.C. & Tacke, F. Role of lymphocytes in liver cancer. Oncoimmunology **2**, e26468 (2013).
- Potikha, T., et al. Interstrain differences in chronic hepatitis and tumor development in a murine model of inflammation-mediated hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 58, 192-204 (2013).
- 248. Barashi, N., *et al.* Inflammation-induced hepatocellular carcinoma is dependent on CCR5 in mice. *Hepatology* **58**, 1021-1030 (2013).
- 249. Ardi, V.C., Kupriyanova, T.A., Deryugina, E.I. & Quigley, J.P. Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 20262-20267 (2007).
- Xu, R., Huang, H., Zhang, Z. & Wang, F.S. The role of neutrophils in the development of liver diseases. *Cellular & molecular immunology* 11, 224-231 (2014).
- 251. Zhou, S.L., et al. Overexpression of CXCL5 mediates neutrophil infiltration and

indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **56**, 2242-2254 (2012).

- 252. Ji, J., *et al.* Hepatic stellate cell and monocyte interaction contributes to poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **62**, 481-495 (2015).
- 253. Zhang, J.P., *et al.* Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Journal of hepatology* **50**, 980-989 (2009).
- 254. Zaidi, M.R. & Merlino, G. The two faces of interferon-gamma in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**, 6118-6124 (2011).

8 Publikationen

- Sellau J., Alvarado C.F., Hoenow S., Mackroth M.S., <u>Kleinschmidt D.</u>, Huber S., Jacobs T.: **IL-22 dampens the T cell response in experimental malaria.** *Scientific reports* 2016, 6:28058.
- Pelczar P., Witkowski M., Perez L.G., Kempski J., Hammel A.G., Brockmann L, <u>Kleinschmidt D</u>., Wende S., Haueis C., Bedke T. *et al*: A pathogenic role for T cell–derived IL-22BP in inflammatory bowel disease. *Science* 2016, 354(6310):358-362.

Teile dieser Arbeit wurden zur Publikation eingereicht.

 <u>Kleinschmidt D.</u>*, Giannou A.D.*, Heather M.M., Kempski J., Steglich B., Huber F.J., Ernst T.M., Shiri A.M., Wegscheid C., Tasika E., Hübener P., Fuchs T., Noll J., Lotter H., Tiegs G., Lohse A.W., Axelrod J.H., Galun E., Flavell R.A., Gagliani N., Huber S.: A protective function of IL-22BP in acute liver injury.

* Equally contributing authors.

9 Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. Burmester danke ich für die Bereitschaft, meine Doktorarbeit von Seiten des Fachbereichs Biologie, der Universität Hamburg zu betreuen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Samuel Huber für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die Möglichkeit selbstständig zu arbeiten und für die Begutachtung meiner Dissertation. Vor allem möchte ich mich für die sehr gute Betreuung der Arbeit und das jederzeit "offene Ohr" bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Laborkollegen von N27 und O58 für die gute Zusammenarbeit, tatkräftige Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Freundin Sabine für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Großer Dank gebührt auch meinen Freunden Sabine, Karo und Dajana, die immer für mich da waren.

Meiner Familie, insbesondere meiner Schwester Ines, danke ich herzlich für die Unterstützung in allen Lebenslagen.

Meinem Freund, Michael, möchte ich von ganzem Herzen für seine Geduld und liebenswürdige Unterstützung danken.

10 Eidesstattliche Versicherung

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

Hamburg, den 04.04.2017

Dörte Kleinschmidt