

Arylhydrocarbonrezeptor: Rollen bei Lebertoleranz und Leberentzündung

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin (Dr. med.)

an der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Andreas Steudter

aus

Soltau

2024

Betreuer:in / Gutachter:in der Dissertation:	Prof. Dr. Johannes Herkel
Gutachter:in der Dissertation:	Prof. Dr. Jörg Heeren
Vorsitz der Prüfungskommission:	Prof. Dr. Jörg Heeren
Mitglied der Prüfungskommission:	Prof. Dr. Christoph Schramm
Mitglied der Prüfungskommission:	Prof. Dr. Uta Herden
Datum der mündlichen Prüfung:	02. September 2025

Inhalt

Inhaltsverzeichnis	I
1. Einleitung	1
1.1. Die besondere immunologische Funktion der Leber.....	1
1.2. Das immunologische Mikromilieu der Leber.....	1
1.2.1. Endothelzellen der Lebersinusoide (LSECs).....	2
1.2.2. Hepatozyten	3
1.2.3. Dendritische Zellen.....	4
1.2.4. Kupffer-Zellen	4
1.2.5. Hepatische Sternzellen	5
1.3. Der Arylhydrocarbonrezeptor (Ahr).....	5
1.3.1. Signalwege des Ahr	5
1.3.2. Ahr-Liganden.....	6
1.3.3. Immunmodulation durch den Ahr	7
1.3.4. Der Ahr als Zielstruktur: Klinische und präklinische Anwendungen	8
1.3.5. Der Ahr in der Leber	9
1.4. Mausmodelle entzündlicher Lebererkrankungen	10
1.4.1. DDC-induzierte cholestatische Leberschädigung	10
1.4.2. Chronische Cholangitis in Mdr2 ^{-/-} Mäusen	11
1.4.3. Akute Cholangitis in K14-OVap Mäusen	11
1.5. Fragestellung dieser Arbeit.....	12
2. Materialien und Methoden	13
2.1. Materialien.....	13
2.1.1. Geräte.....	13
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	13
2.1.3. Chemikalien.....	14
2.1.4. Puffer	15
2.1.5. Antikörper.....	16
2.1.6. Kits.....	16
2.1.7. Software.....	17
2.2. Methoden	18
2.2.1. Mäuse.....	18
2.2.2. DDC-Fütterung.....	20
2.2.3. K14-OVap-Modell	20
2.2.4. Mdr2 ^{-/-} -Modell	20
2.2.5. Leberperfusion und Leberentnahme	21
2.2.6. Aufbereitung von Vollblut und Messung von Transaminasenaktivitäten ...	21
2.2.7. Aufbereitung von Lebergewebe für die Durchflusszytometrie	22
2.2.8. Aufbereitung von Lebergewebe für Zellkulturen.....	22
2.2.9. Milzentnahme und Herstellung von Milz-Einzelzellsuspensionen	23
2.2.10. Mikroskopische Zellzahlbestimmung.....	24
2.2.11. Magnetische Zellseparation	24
2.2.12. Kultur von LSECs	25
2.2.13. In vitro LPS-Stimulation und quantitative IL-6-Messung.....	25
2.2.14. In vitro Treg-Konversionsassay.....	25
2.2.15. Durchflusszytometrie.....	26

2.2.16.	Fixierung und histologische Färbung von Lebergewebe.....	27
2.2.17.	Statistik	28
3.	Ergebnisse.....	29
3.1.	Isolation und Kultur sinusoidaler Leberendothelzellen.....	29
3.2.	Ahr-Abhängigkeit der Endotoxintoleranz von LSECs.....	30
3.3.	Ahr-Abhängigkeit der Treg-Induktion durch LSECs in vitro	33
3.4.	Rolle des Ahr in Modellen entzündlicher Lebererkrankungen	33
3.4.1.	ITE bei DDC-induziertem cholestatischem Leberschaden	34
3.4.2.	Ahr bei Leberschädigung im Mdr2 ^{-/-} Modell	41
3.4.3.	Rolle des Ahr bei autoimmuner Cholangitis (K14-OVAp-Modell).....	49
4.	Diskussion.....	54
4.1.	Die Induktion regulatorischer T-Zellen durch LSECs in vitro ist Ahr-abhängig	54
4.2.	Ambivalente Daten zur Rolle des Ahr bei der Endotoxin-Toleranz in LSECs ...	56
4.3.	Der Ahr-Agonist ITE kann Leberentzündungen unterschiedlicher Genese aggravieren	57
4.4.	Fazit	60
5.	Zusammenfassung / Abstract	61
6.	Abkürzungsverzeichnis	62
7.	Abbildungsverzeichnis	64
8.	Tabellenverzeichnis	66
9.	Literaturverzeichnis	67
10.	Anhang.....	81
	Danksagung.....	83
	Erklärung des Eigenanteils.....	84
	Eidesstattliche Versicherung	85

1. Einleitung

1.1. Die besondere immunologische Funktion der Leber

Die Leber erhält den Hauptteil ihres Blutzeitvolumens über die Pfortader, ist damit dem Darm als Habitat des Mikrobioms, als Resorptions- und Eintrittsorgan für Nahrungs- und mikrobielle Bestandteile und Metaboliten, Pathogene, Toxine und andere Umweltstoffe unmittelbar nachgeschaltet. Ein großer Anteil dieser Fremdstoffe ist harmloser Natur. Neben ihrer metabolischen, exokrinen und endokrinen Schlüsselfunktionen nimmt die Leber hier eine besondere immunologische Stellung ein: Obwohl durchaus in der Lage wirksame Immunantworten einzuleiten, schützt sie durch überwiegende aktive Immunsuppression sich und den Organismus vor inadäquaten Immunantworten. Die Leber gilt daher als tolerogenes Organ.

Diese Eigenschaft trägt etwa zur oralen Toleranz bei, der spezifischen Immunsuppression bei Kontakt mit zuvor bereits ingestierten Antigenen (Weiner et al. 2011; Limmer et al. 2005; Li et al. 2004). Sie erklärt auch die bemerkenswerte Fähigkeit der Leber, Alloimmunität zu modulieren: Abweichend von anderen Organtransplantationen bringt Histokompatibilität (im Sinne eines Humanen Leukozytenantigen (HLA-) Matches) bei Lebertransplantationen kein verbessertes Transplantatüberleben und nach Lebertransplantationen können Immunsuppressiva häufig reduziert und gelegentlich – ein Alleinstellungsmerkmal in der Transplantationsmedizin – auch ganz abgesetzt werden. Ferner verringern Transplantationen von Lebern durch systemische Toleranzinduktion auch die Inzidenz und Schwere von Abstoßungsreaktionen bei simultan transplantierten anderen soliden Organen desselben Spenders (Thomson et al. 2020). Einige hepatotrope Viren, Parasiten und Tumore nutzen tolerogene Mechanismen der Leber hingegen aus, um Persistenz zu etablieren (Zheng und Tian 2019).

1.2. Das immunologische Mikromilieu der Leber

Schlüsselakteure im immunologischen Milieu der Leber sind die im Organ ansässigen Antigen-präsentierenden Zellen (APCs). Dazu gehören parenchymale und sinusoidale Zellen sowie dem Knochenmark entstammende „konventionelle“ APCs. Antigenpräsentationen durch APCs der Leber veranlassen typischerweise tolerogene Immunantworten (Horst et al. 2016; Crispe 2011; Thomson und Knolle 2010).

Die gesunde Leber erhält circa 80 % ihres Blutzeitvolumens über die Pfortader, 20 % über die Arteria hepatica. Nach mehrfachen Aufzweigungen mischt sich im Kapillarbett der Leber, den Lebersinusoiden, schließlich das portalvenöse und arterielle Blut (Abbildung 1). Die variabel niedrigen Perfusionsdrücke und Flussgeschwindigkeiten in den Lebersinusoiden ermöglichen die Versorgung der Hepatozyten als metabolische Einheiten, aber auch eine effiziente Immunüberwachung.

Die Endothelzellen der Lebersinusoide (LSECs) bilden ein histologisch einzigartiges Endothel (Vollmar und Menger 2009): Es verfügt zum einen über keine Basalmembran, ist zum anderen fenestriert und dadurch das durchlässigste Endothel bei Säugetieren. Über Perforationen (Fenestrae) korrespondiert sinusoidales Blut mit dem zwischen LSECs und Hepatozyten gelegenen Disse-Raum. Intrasinusoidal haften dem Endothel Kupffer-Zellen

(KCs) an, perisinusoidal im Disse-Raum finden sich die hepatischen Sternzellen (HSCs). Überwiegend perivaskulär um größere Gefäße, zum Beispiel Gefäße der Portalfelder und Zentralvenen, interstitiell und subkapsulär halten sich dendritische Zellen (DCs) auf (Freitas-Lopes et al. 2017). Alle genannten nicht-parenchymalen Zellen (NPCs) der Leber und Hepatozyten agieren als APCs.

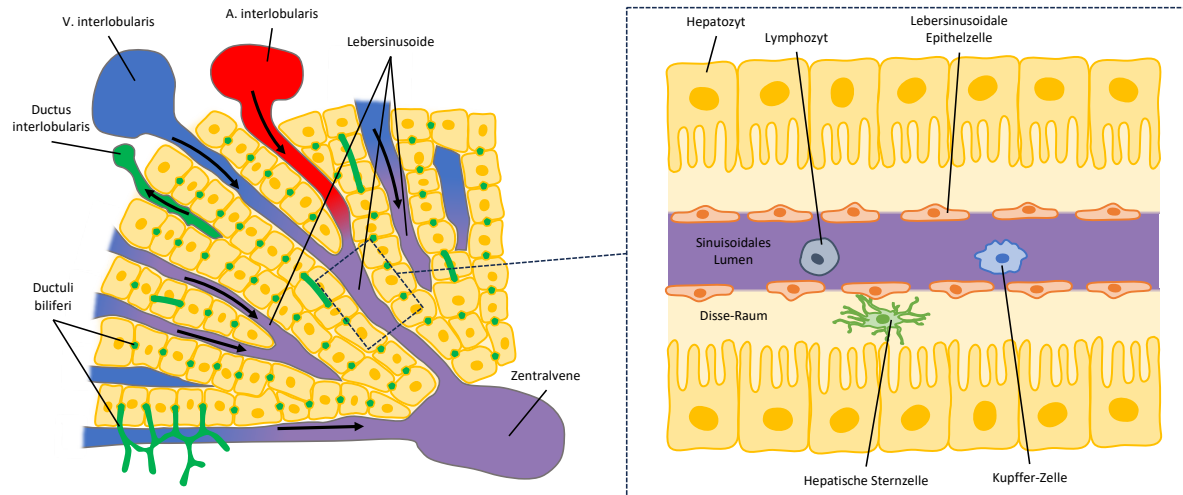


Abbildung 1: Mikrozirkulation in der Leber. Äste der Arteria (A.) hepatica und der Vena (V.) portae versorgen das Organ mit sauerstoffreichem (rot, A. interlobularis) und nährstoffreichem Blut (blau, V. interlobularis), Gallengänge (Ductuli biliferi, in Ductus interlobulares einmündend) sammeln die von den Hepatozyten produzierte Galle. A., V. und Ductus interlobularis bilden gemeinsam ein Portalfeld. Arteriell und portalvenöses Blut konfluieren (lila) in den Lebersinusoiden, die schließlich von der Zentralvene eines Leberläppchens drainiert werden. Endothelzellen der Lebersinusoiden (LSECs) bilden das kapillare Endothel. Hepatische Sternzellen befinden sich zwischen LSECs und Hepatozyten (Disse-Raum), Kupfer-Zellen im sinusoidalen Lumen. Dendritische Zellen der Leber (hier nicht dargestellt) residieren in der Regel um größere Gefäße (Portalfelder, Zentralvenen) und subkapsulär (Abbildung in Anlehnung an Mescher und Junqueira 2013).

1.2.1. Endothelzellen der Lebersinusoiden (LSECs)

Das Endothel der Lebersinusoiden ist eine hochpermeable Barriere und hochspezialisierte Schnittstelle zwischen nähr- und fremdstoffreichem Blut und Leberparenchym. Es wird durch LSECs gebildet, der größten NPC-Population der Leber.

LSECs gehören gemeinsam mit KCs zum retikuloendothelialen System der Leber. Sie sind mit einem breiten Spektrum an Pattern recognition-Rezeptoren, die molekulare Muster mikrobieller Bestandteile erkennen können, ausgestattet und eliminieren zahlreiche endo- und exogene Makromoleküle und kleinere Partikel (Bhandari et al. 2021). Insbesondere sind LSECs auch hauptsächlich für die Clearance hämatogen übertragener Viren verantwortlich (Mates et al. 2017; Ganesan et al. 2011; Breiner et al. 2001). Die Signalwege der beteiligten Rezeptoren in LSECs sind im Sinne der lebertypischen Immunhomöostase an ein permanent hohes Aufkommen mikrobieller Bestandteile adaptiert und unterbinden regelmäßig Entzündungsreaktionen (Wu et al. 2010). Exemplarisch reagieren LSECs auf wiederholte Exposition mit dem Toll-like Rezeptor (TLR) 4-Agonisten Lipopolysaccharid (LPS) mit verringerter Expression von Leukozyten-Adhäsionsmolekülen (Uhrig et al. 2005).

LSECs exprimieren konstitutiv Haupthistokompatibilitätskomplex- (MHC) I und II und können Antigene an Cluster of differentiation (CD) 8-positive ($CD8^+$) und $CD4^+$ T-Zellen präsentieren – typischerweise in Toleranzinduktion oder Suppression von Inflammation resultierend. T-Helferzellen (Th-Zellen) der Gruppen Th1 und Th17 werden durch LSECs

aktiv supprimiert (Neumann et al. 2015; Carambia et al. 2013; Tokita et al. 2006). Priming naiver $CD4^+$ T-Zellen durch LSECs erfordert relativ hohe Antigenkonzentrationen und induziert statt inflammatorischer Phänotypen präferenziell tolerogene regulatorische T-Zellen (Tregs) (Carambia et al. 2014; Kruse et al. 2009; Knolle et al. 1999). LSECs sind unter allen APCs der Leber die potentesten Induktoren antigenspezifischer $CD25^+$ Forkhead box Protein 3-positiver ($Foxp3^+$) Tregs. Diese sind in der Lage, $CD4^+$ T-Zell-vermittelte Immunität systemisch zu supprimieren (Carambia et al. 2015; Carambia et al. 2014; Kruse et al. 2009).

In $CD8^+$ T-Zellen induziert Antigenpräsentation durch LSECs ebenfalls regelmäßig einen tolerogenen Phänotyp (Carambia et al. 2021; Diehl et al. 2008; Limmer et al. 2000). Hohe Antigenkonzentrationen oder virale Infektion der LSECs können diese Eigenschaft allerdings überwinden, sie fördern dann im Sinne einer differenzierten Immunreaktion die Reifung zytotoxischer $CD8^+$ T-Zellen (Kern et al. 2010; Schurich et al. 2010).

1.2.2. Hepatozyten

Hepatozyten sind die häufigsten Leberzellen, stellen den größten Teil der Organmasse und sind wesentlich für Metabolismus, Proteinbiosynthese und Entgiftung im Organismus.

Sie sezernieren ferner konstitutiv eine Reihe von Proteinen des angeborenen Immunsystems, die unmittelbar antibakteriell wirken oder als Opsonine fungieren. In Entzündungssituationen können Hepatozyten die Produktion dieser Proteine um ein Vielfaches steigern (Akute-Phase-Proteine). Sie reagieren dabei zum einen auf inflammatorische Zytokine, insbesondere Interleukin- (IL) 6 und Zytokine der IL-1-Familie, die systemisch von Monozyten und Makrophagen und insbesondere auch lokal von KCs freigesetzt werden (Bode et al. 2012). Zum anderen können sie sich durch LPS-vermittelte IL-6 Produktion autokrin stimulieren (Norris et al. 2014).

Hepatozyten interagieren mittels Mikrovilli über die Fenestrae der Lebersinusoide mit intrasinusoidalen Lymphozyten (Warren et al. 2006). Sie exprimieren konstitutiv MHC-I und sind in der Lage, antigenspezifische $CD8^+$ T-Zellen zu aktivieren. Typischerweise handelt es sich im Sinne einer toleranten $CD8^+$ T-Zell-Antwort um schwache Effektorzellen, die schließlich passiv, das heißt mangels kostimulatorischer Signale („Death by neglect“), oder aktiv zur Apoptose instruiert werden (Holz et al. 2010). Allerdings korrelieren die Expressionsdichte des Antigens und die spezifische $CD8^+$ T-Zellimmunität invers, sodass bei niedriger Antigenkonzentration durchaus auch effektive entzündliche Immunantworten, etwa gegen Erreger viraler Hepatitiden, möglich sind (Ochel et al. 2016).

Im Kontext einer Hepatitis exprimieren Hepatozyten auch MHC-II und vermögen $CD4^+$ T-Zellen zu aktivieren (Herkel et al. 2003). In undifferenzierten $CD4^+$ T-Zellen induzieren sie Th2-Phänotypen und supprimieren die Effektorfunktionen differenzierter Th1-Zellen, die wiederum die antivirale Funktion von $CD8^+$ T-Zellen beeinträchtigen (Wiegand et al. 2007). Hepatozyten entzündeter Lebern sind außerdem selbstständig in der Lage, $CD25^+Foxp3^+$ Tregs zu induzieren (Burghardt et al. 2014).

Die ektopische Expression von Antigenen in Hepatozyten induziert antigenspezifische Tregs, die in Modellen von Autoimmunerkrankungen den Erkrankungsbeginn verhindern oder die

aktive Erkrankung heilen können (Akbarpour et al. 2015; Lüth et al. 2008). Der genaue Mechanismus der Induktion und ob weitere Zellpopulationen erforderlich sind, ist nicht bekannt.

1.2.3. Dendritische Zellen

DCs sind Knochenmark-stämmige beziehungsweise hämatopoetische APCs, die in allen Säugetiergeweben gefunden werden. Überwiegend werden konventionelle myeloische DCs (cDCs) und plasmazytoide DCs (pDCs) unterschieden. Erstere sind exemplarisch für professionelle APCs, indem sie Antigene prozessieren und über MHC-I und -II an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen präsentieren. Abhängig von Umgebungssignalen wie Zytokinen oder Pattern recognition-Rezeptor-Liganden exprimieren cDCs kostimulatorische oder koinhibitorische Moleküle und aktivieren oder inaktivieren T-Zellen antigenspezifisch (Cabeza-Cabrero et al. 2021). pDCs sind relativ ineffiziente APCs, spielen aber als spezialisierte Produzenten von Interferon- α eine wichtige Rolle in der antiviralen Immunantwort, können ferner inflammatorische T-Zell-Funktionen supprimieren und regulatorische fördern (Nakai et al. 2015; Cervantes-Barragan et al. 2012; Matta et al. 2010). Ihre ontogenetische Zugehörigkeit zu den DCs ist umstritten (Cabeza-Cabrero et al. 2021).

Hepatische DCs finden sich vor allem periportal und perizentral, interstitiell zwischen Hepatozyten und innerhalb des Gefäßsystems sowie subkapsulär. Nur etwa 1 % aller NPCs der Leber sind DCs, unter ihnen sind pDCs im Vergleich zu anderen Geweben häufiger. Ihre Progenitorzellen reifen in der Leber bevorzugt zu tolerogenen Phänotypen, vermutlich unter dem parakrinen Einfluss stromaler Zellen (Thomson und Knolle 2010). Verglichen mit DCs in anderen Geweben exprimieren hepatische DCs kaum MHC-II und kaum kostimulatorische Moleküle, ähneln insgesamt unreifen DCs mit verminderten Fähigkeiten, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu stimulieren und proinflammatorisch zu polarisieren (Dou et al. 2018; Bamboat et al. 2009). Sie produzieren anti-inflammatorische Mediatoren wie Prostaglandin E₂, ein Induktor der immunsupprimierenden und Toleranz-induzierenden Indolamin 2,3-Deoxygenase (IDO), IL-10, Transforming growth factor- (TGF) β und IL-27 (Harden und Egilmez 2012; Thomson und Knolle 2010). Dadurch inhibieren hepatische DCs aktiv die Proliferation von T-Zellen, leiten aktivierte T-Zellen zur Apoptose an (Xia et al. 2008) und induzieren IL-10 abhängig Tregs (Bamboat et al. 2009). Hepatische pDCs induzieren in vivo orale Toleranz, indem sie Anergie und Depletion antigenspezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen induzieren (Goubier et al. 2008).

1.2.4. Kupffer-Zellen

KCs sind intrasinusoidale Makrophagen. Sie umfassen bis zu 90 % aller Makrophagen im Körper und bis zu 20 % aller NPCs der Leber. Gemeinsam mit LSECs bilden sie das retikuloendotheliale System der Leber.

Die Population ist unter Normalbedingungen selbsterhaltend mit nur geringfügigem Beitrag durch hämatogene Precursorzellen, unter entzündlichen Bedingungen ist dieser Anteil aber typischerweise deutlich erhöht – die Bedeutung ist unklar (Musrati et al. 2023; Krenkel und Tacke 2017). KCs können funktionell und nach Standort in zwei Subpopulationen eingeteilt werden: Eher periportal finden sich KCs mit tolerogenem Transkriptom und erhöhter Fähigkeit zur Phagozytose, eher perizentral solche mit inflammatorischem Phänotyp (MacParland et al. 2018; Kinoshita et al. 2010).

KCs verfügen, ähnlich wie LSECs, über eine große Bandbreite an Pattern recognition-Rezeptoren und sind standortgemäß an eine chronische Exposition mit entsprechenden Stimuli adaptiert (Thomson und Knolle 2010; Seki und Brenner 2008). Sie exprimieren, analog zu DCs der Leber, in Homöostase wenig MHC-II und kaum kostimulatorische Moleküle, sind ferner Hauptproduzenten von IL-10 und TGF- β und begünstigen so immunsupprimierende Tregs. Unter entzündlichen Bedingungen oder pathologischer TLR-Stimulation können KCs hingegen einen immunogenen Phänotyp annehmen und inflammatorische Zytokine sezernieren (Horst et al. 2016; Thomson und Knolle 2010).

1.2.5. Hepatische Sternzellen

HSCs sind perisinusoidal im Disse-Raum beheimatete mesenchymale Zellen, die unter Normalbedingungen nonproliferativ sind und insbesondere als Hauptdepot für Vitamin A dienen. In sämtlichen Konstellationen von Leberschädigungen können HSCs zu proliferativen Myofibroblasten transdifferenzieren und Fibrogenese betreiben. Während und nach Ausheilung von Leberschäden sind sie entscheidend an der Geweberegeneration beteiligt (Kamm und McCommis 2022).

Inwiefern HSCs eine Rolle in inflammatorischen oder tolerogenen hepatischen Immunantworten spielen ist kaum definiert. Sie exprimieren Pattern recognition-Rezeptoren, MHC-I, -II und kostimulatorische Moleküle. Zumindest bei chronischen Leberschädigungen wird ihnen typischerweise eine proinflammatorische Rolle zugeschrieben, sie scheinen allerdings auch gegenteilige Kapazitäten zu haben (Kamm und McCommis 2022; Liew und Kubes 2016; Thomson und Knolle 2010).

1.3. Der Arylhydrocarbonrezeptor (Ahr)

Um Umweltbedingungen und metabolische Informationen in physiologische Prozesse zu integrieren, bedient sich der Organismus Chemosensoren. Dazu gehört der Arylhydrocarbonrezeptor (Ahr), ein phylogenetisch hoch konservierter ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor aus der Basic helix-loop-helix/Per-ARNT-Sim Proteinfamilie (Hahn 2002).

Der Ahr wurde als Rezeptor des toxischen 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxins (TCDD) und Induktor des entgiftenden Cytochrom P450-Enzyms (CYP) CYP1A1 erstbeschrieben. Während er im toxikologischen Kontext gut definiert ist, zeichnet sich heute insgesamt ein erheblich komplexeres und durchaus diffuseres Bild. Außer TCDD sind mittlerweile eine Vielzahl weiterer xenobiotischer und natürlicher, das heißt diätetischer und endogener Ahr-Liganden bekannt und es wurden zahlreiche weitere Ahr-Funktionen entdeckt, etwa in der Immunmodulation, Organogenese, Reproduktion, Kanzerogenese und der zirkadianen Rhythmik. Die Effekte einer Ahr-Aktivierung sind Spezies-, Gewebe- und Liganden-abhängig (Kou und Dai 2021; Avilla et al. 2020).

1.3.1. Signalwege des Ahr

Der inaktive Ahr liegt mit mehreren Chaperonen als zytoplasmatischer Komplex vor. Nach Bindung eines Liganden dissoziiert der Proteinkomplex und der Ahr transloziert in den Nukleus, um dort mit dem Ahr nuclear translocator (ARNT) zu dimerisieren. Das Dimer (Ahr/ARNT) bindet Xenobiotic response elements (XRE) in den Promotoren von Zielgenen

und aktiviert deren Transkription (Larigot et al. 2018). Dieser klassische genomische Signalweg des Ahr ist in Abbildung 2 dargestellt. Ahr/ARNT kann allerdings auch XRE-unabhängig mit DNA interagieren (Lo und Matthews 2012).

Nach Translokation wird der Ahr fortlaufend rasch nukleär exportiert, ubiquitiniert und vom Proteasom degradiert. Ein wichtiges Zielprotein des Ahr ist der Ahr repressor, der im Sinne einer negativen Rückkopplung kompetitiv mit ARNT dimerisiert, dann ebenfalls XRE bindet, aber die Transkription von Ahr-Zielgenen negativ moduliert.

Alternativ vermag der Ahr diverse nicht-genomische Signalwege, etwa MAP-Kinase-Wege, zu aktivieren oder mit anderen Transkriptionsfaktoren zu interagieren (Larigot et al. 2018).

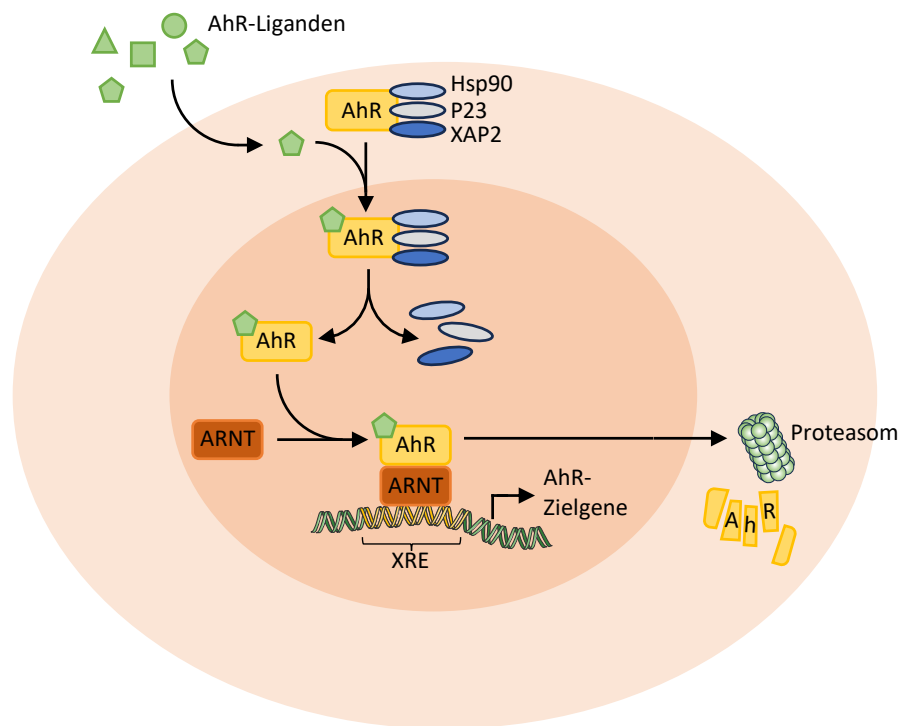


Abbildung 2: Genomischer Signalweg des Arylhydrocarbonrezeptors. Der inaktive Ahr liegt zytosolisch als Komplex mit mehreren Chaperonen vor. Seine Liganden diffundieren meist passiv über die Zellmembran, binden den Ahr und ermöglichen dann seine Translokation in den Nukleus. Dort dimerisiert der Ahr mit dem Ahr nuclear translocator (ARNT) und induziert Zielgene durch Bindung von Xenobiotic response elements (XRE) in ihren Promotoren. Der Ahr wird nukleär exportiert und zügig vom Proteasom lysiert (Abbildung in Anlehnung an Larigot et al. 2018, erstellt unter Verwendung von Servier Medical Art (smart.servier.com) unter einer Creative Commons 4.0 Lizenz).

1.3.2. Ahr-Liganden

Die Liste bekannter und putativer Agonisten und Antagonisten des Ahr ist lang und umfasst eine erhebliche Bandbreite struktureller chemischer Eigenschaften, vermutlich als Konsequenz seiner promiskuen Ligandenbindungsstelle (Soshilov und Denison 2014). Grundsätzlich können Ahr-Liganden in zwei Gruppen unterteilt werden: Synthetische und natürliche.

Zu den synthetischen Ahr-Liganden gehören erstens untereinander strukturverwandte „klassische“ Liganden aus der Gruppe der polyzyklischen und der halogenierten aromatischen Hydrocarbone. Darunter fallen die potentesten Ahr-Agonisten, etwa TCDD und 1,2-Benzpyren. Viele dieser Substanzen sind toxische und umweltsichere Nebenprodukte der che-

mischen Industrie. Zweitens sind zahlreiche mehr oder weniger chemisch verwandte synthetische Liganden mit typischerweise deutlich geringerer Affinität beschrieben, etwa der Protonenpumpeninhibitor Omeprazol (Denison und Nagy 2003).

Die meisten bekannten natürlichen Ahr-Liganden sind pflanzlichen Ursprungs. Säugetiere sind ihnen in relevantem Ausmaß durch Nahrungsaufnahme exponiert. Flavonoide, die größte bekannte Gruppe natürlicher Ahr-Liganden, Agonisten und Antagonisten umfassend, kommen in ausreichender Konzentration im menschlichen Blut vor, um Ahr zu aktivieren oder zu inhibieren (Nguyen und Bradfield 2008; Denison und Nagy 2003). Einige der potentesten natürlichen Ahr-Liganden sind Metaboliten des Mikrobioms, über die sich der Ahr vielfältig an Wirt-Mikrobiom-Interaktionen beteiligt (Dong und Perdew 2020).

Diverse endogene Moleküle sind ebenfalls Liganden des Ahr. Seine phylogenetische Konservierung, typische Defekte in Ahr-Knockout-Mäusen und Anhalte für seine Aktivierung während der Embryogenese sprechen ferner für die physiologische Relevanz endogen aktivierter Ahr-Signalwege. Die meisten bislang beschriebenen endogenen Ahr-Liganden sind Tryptophan-Metaboliten.

L-Kynurenin (L-Kyn) ist das Hauptprodukt der IDO, des Schlüsselenzyms des Kynurenin-Signalweges. L-Kyn fördert Ahr-abhängig die Differenzierung von Tregs und induziert in DCs die Expression von IDO1 im Sinne eines positiven Feedbacks. DCs nutzen Tryptophan-Deprivation mittels IDO (Tryptophan-arme Mikromilieus beeinträchtigen Effektor-T-Zellen und stabilisieren Treg-Populationen) auch Ahr-unabhängig als immunsuppressiven Mechanismus (Pallotta et al. 2022; Nguyen et al. 2014).

Gut belegt ist ferner die Photoproduktion des Tryptophan-Metaboliten 5,11-Dihydroindolo[3,2-*b*]carbazol-6-carbaldehyd (FICZ), eines Ahr-Agonisten mit TCDD-vergleichbarer Affinität, in menschlicher Haut. 2-(1'-H-Indol-3'-carbonyl)-thiazol-4-carboxylsäuremethylester (ITE), ebenfalls ein Tryptophan-Derivat und vergleichbar mit TCDD und FICZ potenter Ahr-Agonist, kann aus Schweinelungen isoliert werden. Möglicherweise handelt es sich aber um ein Beiprodukt des Extraktionsprozesses, der hohe Temperatur und Azidität erfordert (Stejskalova et al. 2011; Nguyen und Bradfield 2008).

Mehrere Ahr-Liganden sind ferner in klinischer Anwendung oder Erprobung (siehe 1.3.4).

1.3.3. Immunmodulation durch den Ahr

Der Ahr wird in hoher Dichte in Immunzellen und in Barriereorganen wie dem Intestinum, der Leber, Haut, Lunge und Plazenta exprimiert. Insgesamt zeichnet sich über zahlreiche Untersuchungen ein mehrdimensionales Bild: Je nach immunologischem Szenario können Ahr-Signalwege sowohl pro- als auch antiinflammatorische (Netto-) Effekte haben (Fernández-Gallego et al. 2021; Poulain-Godefroy et al. 2020; Shinde und McGaha 2018).

1.3.3.1. Ahr in Antigen-präsentierenden Zellen

APCs sind eine der ersten Verteidigungslinien gegen Pathogene und für die Homöostase immunogener und tolerogener T-Zell-vermittelter Immunantworten entscheidend. Der Ahr reguliert Differenzierung und Funktion von APCs und ist daher eine Komponente ihrer funktionellen Plastizität.

In DCs interagiert der Ahr mit wichtigen Transkriptionsfaktoren oder reguliert deren Expression und Abbau, insbesondere liegen Daten zum NF- κ B-Signalweg vor. Während Ahr-Aktivierung mit TCDD die Expression von MHC-II, kostimulatorischen Molekülen und proinflammatorischen Zytokinen geringfügig steigert, hat ITE den gegenteiligen Effekt. Gleichzeitig werden – offenbar Liganden-unabhängig – die Expression vonIDO und von Enzymen des Retinolsäure-Metabolismus hochreguliert und somit die Differenzierung von Tregs stimuliert (Gutiérrez-Vázquez und Quintana 2018).

DC-vermittelte Endotoxintoleranz, im Speziellen Immunsuppression durch wiederholte LPS-Exposition, ist Ahr- und IDO-abhängig (Bessede et al. 2014). Systemische Behandlung mit den Ahr-Agonisten TCDD oder ITE verbessert in mehreren Modellen autoimmuner Erkrankungen die Verläufe, mindestens anteilig durch tolerogene Effekte in DCs (Kenison et al. 2020; Yeste et al. 2016; Takenaka und Quintana 2016; Duarte et al. 2013; Quintana et al. 2010). Inwieweit die tolerogenen Eigenschaften von APCs der Leber Ahr-abhängig sind, ist jedoch bislang weitestgehend unbekannt.

1.3.3.2. Ahr in T-Zellen

Der Ahr moduliert die Differenzierung und die Funktion von T-Zellen auch direkt (auf T-Zell-Ebene). Er wird in Th17-Zellen stark, in Tregs und Typ-1-regulatorischen (Tr1-) Zellen wenig und in Th1- und Th2-Zellen überhaupt nicht exprimiert (Stockinger et al. 2014). Es liegen allerdings nur eingeschränkt Daten zu Subpopulations- und Einzelzellanalysen vor, etwa anatomischen Standorten zugeordnete Expressionsmuster.

Th17-Zellen sind entscheidende pathogene Effektorzellen in autoimmunen Entzündungen. Ahr-Aktivierung fördert und disinhibiert die Reifung von Th17-Zellen in frühen Phasen und ist erforderlich für deren Produktion von IL-22 (gleichsam in Th22- und Gruppe 3 innate lymphoid Zellen) (Gutiérrez-Vázquez und Quintana 2018; Zhou 2016). Th17-Zellen sind nur IL-23-abhängig pathogen und exprimieren dann interessanterweise weniger Ahr als nicht-pathogene Th17-Zellen (Lee et al. 2012). Der Ahr ist auch erforderlich für die Transdifferenzierung von Th17-Zellen in einen tolerogenen Tr1-Phänotyp (Gagliani et al. 2015).

Die Bedeutung des Ahr in Tregs (Foxp3⁺) und Tr1-Zellen (Foxp3⁻) ist weitgehend unbekannt. Intestinale Tregs exprimieren den Rezeptor vermehrt – allerdings offenbar unabhängig von diätetischen Ahr-Liganden und unabhängig von einer antibiotischen Eradikation des intestinalen Mikrobioms – und vermutlich ist ihre Migration in das Intestinum (Homing) Ahr-abhängig (Xiong et al. 2020; Ye et al. 2017). In einem Enteritis-Mausmodell sind Tregs mit konditionellem Ahr-Knockout beeinträchtigt immunsuppressiv (Ye et al. 2017). Untersuchungen an Ahr-defizienten Mäusen oder Tieren mit mutiertem, weniger Liganden-affinem Ahr zeigen entweder beeinträchtigte oder begünstigte Differenzierung und Funktion regulatorischer T-Zellen. Die entsprechenden Auswirkungen systemischer Aktivierung von Ahr-Agonisten sind Liganden-abhängig. Methodisch bedingt ist unbekannt, inwiefern diese Effekte auf unmittelbarer Ebene der regulatorischen T-Zellen Ahr-abhängig sind (Prasad Singh et al. 2020; Gutiérrez-Vázquez und Quintana 2018; Zhou 2016).

1.3.4. Der Ahr als Zielstruktur: Klinische und präklinische Anwendungen

Der Ahr ist eine attraktive Zielstruktur für die therapeutische Immunmodulation, vor allem aufgrund seiner tolerogenen Eigenschaften. Vor dem Hintergrund ambivalenter Daten zur

Rolle des Ahr in Lebererkrankungen ist im Zusammenhang mit dieser Arbeit vordringlich relevant, dass überhaupt spezifische Ahr-Liganden in klinischer Anwendung und Erprobung sind. Entsprechend soll hier lediglich ein kurzer Überblick geleistet werden.

Der topisch angewandte Ahr-Agonist Tapinarof, ursprünglich aus endosymbiotischen Bakterien in insektenpathogenen Nematoden isoliert, ist seit einigen Jahren als first-in-class Wirkstoff in China und den USA zur topischen Behandlung der Psoriasis zugelassen. Er ist auch bei atopischer Dermatitis wirksam und in dieser Indikation in Phase III-Studien in Erprobung (Bissonnette et al. 2023). Tapinarof reduziert Ahr-abhängig die Expression Th-17-polarisierender Zytokine, induziert pathologisch herunterregulierte Gene, die mit der Keratinozytendifferenzierung in Verbindung gebracht werden, und antioxidative Signalwege (Bissonnette et al. 2021). Der Wirkstoff illustriert das therapeutische Potenzial von Ahr-Agonisten. In präklinischen Studien zeigen weitere Agonisten Wirkung bei Autoimmunerkrankungen und entzündlichen Erkrankungen, etwa in Modellerkrankungen für multiple Sklerose, entzündliche Darmerkrankungen, rheumatoide Arthritis und Diabetes mellitus Typ I (Huang et al. 2023; Rothhammer und Quintana 2019).

In Tumorzellen tritt der Ahr sowohl als Onkogen als auch als Tumorsuppressor in Erscheinung. Mechanistisch sind dabei neben weiteren Dysregulationen, die nicht im engeren Sinne immunologischer Natur sind, zum einen das Hijacking tolerogener Signalwege, zum anderen die Suppression krankheitsfördernder chronischer Inflammation als potenzielle Angriffspunkte für Ahr-Antagonisten respektive -Agonisten beschrieben (Paris et al. 2021). Bislang werden zwei Ahr-Antagonisten in Phase I-Studien erprobt: IK-175 (McGovern et al. 2022) und BAY2416964 (Dumbrava et al. 2023) sollen Ahr-vermittelter Tumor-Immunevasion entgegenwirken.

1.3.5. Der Ahr in der Leber

Die Leber ist über die Darm-Leber-Achse fortwährend Ahr-Liganden exponiert und produziert solche auch selbst. Der Rezeptor ist in der Leber stark exprimiert und erfüllt durch Induktion von CYPs in Hepatozyten eine offensichtliche metabolische Funktion (Fujii-Kuriyama und Mimura 2005), er spielt jedoch auch bei der Organentwicklung und bei Leberschädigungen unterschiedlicher Ätiologie eine Rolle.

Ahr-defiziente Mäuse zeigen neben weiteren extrahepatischen vaskulären Pathologien einen zeitlebens patenten Ductus venosus mit beeinträchtigter Leberperfusion und geringerer Lebermasse (Harstad et al. 2006). Vermutlich ist für den physiologischen Verschluss des Ductus venosus ein intakter Ahr in Endothelzellen erforderlich (Walisser et al. 2005). Ahr-defiziente Tiere entwickeln frühzeitig portale Fibrose, mutmaßlich in Folge eines gestörten Vitamin A-Metabolismus mit Anreicherung des Vitamins in HSCs (TCDD induziert umgekehrt einen gesteigerten Vitamin A-Umsatz). Fütterung einer Vitamin A-freien Diät kann die Fibrose in Ahr-defizienten Mäusen umkehren (Andreola et al. 2004). Tatsächlich reicht ein konditioneller Ahr-Knockout in HSCs aus, um für eine spontane Leberfibrose zu prädisponieren, ein konditioneller Knockout in Hepatozyten oder KCs hingegen nicht (Yan et al. 2019).

Scheinbar paradoxerweise verursacht der Ahr-Agonist TCDD ebenfalls eine Leberfibrose (Pierre et al. 2014). Korrespondierend augmentiert TCDD die Aktivierung von HSCs bei

Tetrachlormethan-induzierter Leberfibrose (Lamb et al. 2016). Der Ahr-Ligand ITE hat hingegen im gleichen Modell den gegenteiligen Effekt und wirkt antifibrotisch in HSCs (Yan et al. 2019). Tiere mit konditionellem Ahr-Knockout in Hepatozyten sind vor TCDD-Hepatotoxizität geschützt (Walisser et al. 2005).

Die zitierten Arbeiten legen insgesamt nahe, dass TCDD primär hepatotoxisch wirkt mit sekundärer Inflammation, HSC-Aktivierung und Fibrose, möglicherweise als Konsequenz seiner Biopersistenz und hohen Affinität, die gemeinsam in einer anhaltenden und potenten Ahr-Aktivierung resultieren. Übereinstimmend verlagert TCDD in vitro das transkriptionelle Programm des Ahr erheblich und schaltet dabei endogene Interaktionen mit anderen Genclustern aus (Sartor et al. 2009). Dies trifft auf im weiteren Sinne natürliche Liganden mit typischerweise deutlich kürzeren Halbwertszeiten und bei intermittierender Gabe eher pulsatiler Ahr-Aktivierung, gegebenenfalls auch erheblich niedrigerer Ahr-Affinität als TCDD, vermutlich nicht in gleicher Weise zu.

Der aktuell als nichttoxisch geltende Ahr-Agonist ITE und der endogene Agonist FICZ aggravierend in Mäusen bereits in geringen Dosierungen die Hepatotoxizität von Paracetamol durch Induktion von CYP1A2 in Hepatozyten. Für eine primäre Hepatotoxizität der beiden Liganden besteht weiterhin kein Anhalt (Schuran et al. 2021).

Möglicherweise hat der Ahr eine Bedeutung bei der Genese der nicht-alkoholischen Fettleber und bei deren Folgeerkrankungen. Während Studien mit Ahr-Knockouts, konstitutionell aktivem Ahr und hochaffinen biopersistenten Liganden wie TCDD in entsprechenden Modellerkrankungen eher auf eine insgesamt krankheitsfördernde Rolle hinweisen, werden einigen endogenen und mikrobiellen Ahr-Agonisten auch protektive oder perspektivische therapeutische Potenziale zugeschrieben. In beide Richtungen sind jeweils mehrere molekulare Mechanismen und korrespondierende übergeordnete Effekte (etwa auf Steatose, Inflammation und Fibrose) beschrieben (Patil et al. 2023).

Insgesamt kommt dem Ahr innerhalb der Leber erwartungsgemäß keine eng definierbare Rolle zu. Insbesondere gibt es aber Anhaltspunkte für kontextuell leberschädigende Wirkungen von Ahr-Agonisten, die in der Literatur bislang überwiegend als nichttoxisch angesehen werden.

1.4. Mausmodelle entzündlicher Lebererkrankungen

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, die Bedeutung des Ahr bei entzündlichen Lebererkrankungen zu untersuchen. Dafür wurden drei Mausmodelle mit Cholangiopathien und konsekutivem entzündlichen Leberschaden unterschiedlicher Genese genutzt. Entweder wurden Tiere mit konditionellem Ahr-Knockout in Leberzellen verwendet oder die Tiere wurden systemisch mit dem als nichttoxisch geltenden Ahr-Agonisten ITE behandelt.

1.4.1. DDC-induzierte cholestatische Leberschädigung

Durch Fütterung von 3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidin (DDC) kann in Mäusen eine sklerosierende Cholangitis mit biliärer Fibrose erzeugt werden, die insbesondere histologische Ähnlichkeit zur primär sklerosierenden Cholangitis im Menschen aufweist (Mariotti et al. 2019; Fickert et al. 2007). DDC verursacht durch Störung der hepatischen Häm-Synthese – Mechanismus ist eine Methylierung von Häm mit Bildung des Ferrochelatase-Inhibitor N-Methylprotoporphyrin und wegfallendem negativen Feedback von Häm auf

die δ -Aminolävulinatsynthase – eine zytoplasmatische Akkumulation und vermehrte biliäre Sekretion von Porphyrinen mit Bildung kanalikulärer Porphyrin-Konkremente, die eine obstruktive Cholestase und Pericholangitis verursachen (Maitra et al. 2019; Fickert et al. 2007). Die Zusammensetzung der Gallensäuren wird durch DDC nicht beeinflusst (Fickert et al. 2007), ist jedoch entscheidend für dessen Hepatotoxizität: Mäuse mit weniger toxischem Gallensäure-Profil weisen Porphyrin-Konkremente auf, erleiden aber keinen hepatozellulären Schaden (Fuchs et al. 2017).

Typischerweise wird DDC in einer Konzentration von 0,1 % ad libitum verfüttert (Pose et al. 2019). In C57BL/6 Mäusen zeigen sich nach einem Tag periportale entzündliche Infiltrate und fleckförmige parenchymale Nekrosen. Nach drei Tagen sind erste Zeichen periduktalen fibrotischen Umbaus, erste intraduktale Porphyrin-Konkremente und kompensatorische Zeichen der hepatozytären Regeneration mit rückläufiger Nekrosendichte nachweisbar (Jemail et al. 2018). Aufgrund der Induzierbarkeit und des anfänglich rasch progredienten Verlaufs erlaubt das Modell insbesondere auch die Untersuchung der Frühphase eines erworbenen cholestatischen Leberschadens. Im weiteren zeigen sich eine progrediente Cholangitis und eine progrediente konzentrische periduktale Fibrose (Fickert et al. 2014).

1.4.2. Chronische Cholangitis in Mdr2^{-/-} Mäusen

Multi drug resistance protein 2-defiziente (Mdr2^{-/-}) Mäuse zeigen eine chronisch progrediente sklerosierende Cholangitis, ebenfalls mit histologischer Ähnlichkeit zur menschlichen primär sklerosierenden Cholangitis. In der gesunden Leber ist die tensidische Wirkung der Gallensäuren durch Aggregation in gemischten Mizellen mit Phospholipiden und Cholesterin deutlich abgeschwächt; Mdr2 vermittelt die kanalikuläre Sekretion von Phospholipiden durch Hepatozyten. In Mdr2^{-/-} Mäusen bewirken daher erhöhte intraduktale Konzentrationen freier Gallensäuren schrittweise zunächst eine toxische Cholangitis mit Austritt von Gallensäuren in Portalfelder und in der Folge eine periduktale Entzündung mit Infiltration neutrophiler Granulozyten, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, periduktaler Fibrose und schließlich Atrophie und Absterben der Gallengangepithelien (Mariotti et al. 2019; Fickert et al. 2004).

Ab der zweiten bis dritten Lebenswoche zeigen Mdr2^{-/-} Mäuse eine vermehrte Gallengangproliferation, Cholangitis, portale Entzündung und mäßige Fibrose, die etwa bis zum dritten Lebensmonat progredient sind (Mauad et al. 1994) und bei weiblichen Tieren schwerer ausfallen als bei männlichen (van Nieuwerk et al. 1997). Nach zwölf Monaten finden sich typischerweise einzelne dysplastische Herde und selten Karzinome, ab dem 16. Lebensmonat weisen nahezu alle Tiere hepatozelluläre Karzinome auf (Katzenellenbogen et al. 2007; Katzenellenbogen et al. 2006).

1.4.3. Akute Cholangitis in K14-OVap Mäusen

K14-OVap Mäuse ermöglichen die Induktion und Untersuchung einer antigenabhängigen akuten CD8⁺ T-Zell-vermittelten Cholangitis. Die Tiere exprimieren unter Kontrolle des Keratin 14 Promotors das Ovalbuminpeptid SIINFEKL unter anderem in biliären Epithelzellen und präsentieren es dort über MHC-I (McGargill et al. 2002). CD8⁺ T-Zellen aus OT-1 Mäusen tragen einen transgenen T-Zell-Rezeptor, der SIINFEKL erkennt (Hogquist et al. 1994). Durch adoptiven Zelltransfer von OT-1 CD8⁺ T-Zellen kann in weiblichen K14-OVap Mäusen eine binnen fünf Tagen nachweisbare akute Cholangitis mit periduktalen

lymphozytären Infiltraten und milder extrahepatischer Beteiligung induziert werden (Stein et al. 2021; Schwinge et al. 2015). Dabei werden endogene CD4⁺ T-Zellen in die Leber rekrutiert, die auch in Abwesenheit von OT-1 CD8⁺ T-Zellen bei Transfer in gesunde K14-OVAp Mäuse eine Leberentzündung erzeugen. Das Modell zeigt eine Testosteron-abhängige leberspezifische weibliche Prädominanz, männliche Tiere zeigen ausschließlich extrahepatische Beteiligung und eine geringere Dichte CD4⁺ T-Zellen im Lebergewebe (Schwinge et al. 2015).

1.5. Fragestellung dieser Arbeit

Die Leber ist eine immunologische Schnittstelle zwischen Umwelt und Organismus. Als Verdauungs- und Filterorgan ist sie einerseits in besonderem Maße fähig, Toleranz gegenüber harmlosen Immunogenen zu vermitteln und kann andererseits aktive Immunabwehr betreiben. Schlüsselakteure der Immunregulation innerhalb der Leber sind die dort ansässigen APCs (Horst et al. 2016; Crispe 2011; Thomson und Knolle 2010).

Der Ahr ist ein bedeutender und vielseitiger Modulator immunogener und tolerogener Mechanismen auf mehreren Ebenen des Immunsystems, unter anderem in APCs. Er integriert Umwelteinflüsse, die über entsprechende Ahr-Liganden vermittelt werden, in Immunantworten und ist eine Zielstruktur therapeutischer Immunmodulation – insbesondere bei autoimmunen Erkrankungen und zum Beispiel durch die APC-vermittelte Induktion antigenspezifischer Tregs (Barroso et al. 2021; Gutiérrez-Vázquez und Quintana 2018).

Die Bedeutung des Ahr innerhalb des immunologischen Milieus der Leber ist bislang wenig erforscht und es ist weitgehend unbekannt, ob die tolerogenen Funktionen von APCs der Leber, zum Beispiel die Induktion von Tregs durch LSECs (Carambia et al. 2015; Carambia et al. 2014), ebenfalls Ahr-abhängig sind. Möglicherweise ergeben sich daraus Implikationen für das Indikationsspektrum und die Anwendungssicherheit systemischer Ahr-modulierender Therapien, die aktuell in präklinischen Studien insbesondere zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen getestet werden (Huang et al. 2023; Rothhammer und Quintana 2019).

Folgende Fragestellungen sind Gegenstand dieser Arbeit:

1. LSECs sind in besonderem Maße in der Lage, antigenspezifische Tregs zu induzieren. Ist diese Eigenschaft abhängig von der Expression des Ahr in LSECs oder beeinflussbar durch seine pharmakologische Aktivierung?
2. Wie wirkt sich therapeutische Aktivierung durch die systemische Gabe von Ahr-Liganden oder eine Ahr-Inhibition (konditioneller Ahr-Knockout in APCs) auf den Verlauf von entzündlichen Lebererkrankungen im Mausmodell aus?

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Ort</i>
CO ₂ -Inkubator	Sanyo	Moriguchi, Japan
Durchflusszytometer LSR II	BD Biosciences	Franklin Lakes, New Jersey, USA
Durchlichtmikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Feinwaage A200S	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop BZ-9000	Keyence	Osaka, Japan
Heizblock ThermoMixer C	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Kühlgerät (-80 °C)	Sanyo Denki	Moriguchi, Japan
Kühlgeräte (4 °C und -20 °C)	Liebherr	Bulle, Schweiz
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments	Schwabach, Deutschland
Magnetständer MACS MultiStand	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikroplatten-Reader Infinity F50	Tecan Group	Männedorf, Schweiz
Mikrotom CUT 5062	SLEE medical	Nieder-Olm, Deutschland
Pipetten Research plus und Multi-pette Stream	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetboy	Integra Biosciences	Zizers, Schweiz
Reagenzglasschüttler Vortex Genie 2	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Rollenpumpe	Ismatec	Glattbrugg, Schweiz
Sicherheitswerkbank DLF BSS6	Clean Air Technik	Woerden, Niederlande
Zählkammer Neubauer-improved	Paul Marienfeld	Lauda-Königshofen, Deutschland
Zentrifuge Avanti J-20XP	Beckman Coulter	Brea, Kalifornien, USA
Zentrifuge Bio B	Heraeus	Hanau, Deutschland
Zentrifuge MyFuge 12	Benchmark Scientific	Sayreville, New Jersey, USA
Zentrifugen 5417R und 5810R	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

Tabelle 1: Verwendete Geräte.

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

<i>Verbrauchsmaterial</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Ort</i>
Deckgläser	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Durchflusszytometrie-Röhrchen	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Einmalspritzen Injekt	B. Braun	Melsungen, Deutschland
Gewebe-Einbettkassetten	KABE-Labortechnik	Nümbrecht, Deutschland
Kanülen (27 Gauge)	BD Biosciences	Franklin Lakes, New Jersey, USA
Mikrotiterplatten (96-well)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Objektträger SuperFrost Plus	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA

<i>Verbrauchsmaterial</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Ort</i>
Pipettenspitzen	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatten (96-well)	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Zellseparationssäulen für magnetisch aktivierte Zellsortierung (MACS)	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
Zellsiebe Falcon (40 µm und 100 µm)	Corning	Corning, New York, USA
Zellsiebe MACS Pre-Separation Filters und MACS SmartStrainers	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
Zentrifugenröhrchen Cellstar (15 ml und 20 ml)	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
Zentrifugenröhrchen SafeSeal (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml und 5 ml)	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

2.1.3. Chemikalien

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Ort</i>
Aceton	Th. Geyer	Renningen, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roche	Mannheim, Deutschland
CH223191	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
DDC	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Dichtegradientenmedium OptiPrep (Iodixanol-Lösung)	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva Electrophoresis	Heidelberg, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Eindeckmittel Entellan	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Eosin G-Lösung	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ethanol (vergällt)	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories	Freiburg im Breisgau, Deutschland
FICZ	Enzo Life Sciences	Lörrach, Deutschland
Hämalaun nach Meyer	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Hepes	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Humanes rekombinantes TGF-β	R&D Systems	Minneapolis, Minnesota
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
ITE	Tocris	Bristol, Vereinigtes Königreich
ITE	MedChemExpress	Monmouth Junction, New Jersey, USA
Ketamin (Ketamidol)	Wirtschaftsgenossenschaft Deutscher Tierärzte	Hannover, Deutschland
Kollagen R	Serva Electrophoresis	Heidelberg, Deutschland
Kollagenase	Nordmark Pharma	Uetersen, Deutschland

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Ort</i>
Kompensations-Beads OneComp e-Beads	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
L-Kynurenin	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
LPS aus E. coli O55:B5	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Maisöl	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
MOG 35-55 Peptid	PANATecs	Heilbronn, Deutschland
Pacific Orange-Succinimidylester (PaCO-NHS)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Panserin 401	Pan Biotech	Aidenbach, Deutschland
Paraformaldehyd	Morphisto	Offenbach am Main, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Siriusrot (Direktrot 80)	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
TCDD	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Toluol	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Xylazin (Rompun)	Bayer	Leverkusen, Deutschland
Xylol	Th. Geyer	Renningen, Deutschland

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.

2.1.4. Puffer

<i>Puffer</i>	<i>Bestandteile</i>	<i>Konzentrationen</i>
Ammoniumchlorid-Kalium-Puffer	Aqua dest.	Lösungsmittel
	EDTA	100 mM
	KHCO ₃	10 mM
	NH ₄ Cl	150 mM
Balancierte Salzlösung nach Gey (GBSS)	Aqua dest.	Lösungsmittel
	NaCl	137 mM
	KCL	5 mM
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,6 mM
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,9 mM
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,3 mM
	KH ₂ PO ₄	0,2 mM
	Na ₂ HPO ₄	1,7 mM
	NaHCO ₃	2,7 mM
	D(+)-Glucose	5,5 mM
	Hepes	50 mM
Magnetische Zellseparation-(MACS) Puffer	PBS	Lösungsmittel
	BSA	0,5 %
	EDTA	2,5 mM
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Aqua dest.	Lösungsmittel
	KCl	2,7 mM
	KH ₂ PO ₄	1,5 mM
	NaCl	137 mM
	Na ₂ HPO ₄	6,5 mM

Tabelle 4: Verwendete Pufferlösungen.

2.1.5. Antikörper

<i>Antigen, Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Ort</i>
CD11c MicroBeads	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
CD146 (LSEC) MicroBeads	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
CD16/32	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
CD25 MicroBeads	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
CD25 (Klon PC 61), PE-gekoppelt	BioLegend	San Diego, Kalifornien, USA
CD4 MicroBeads	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
CD8 MicroBeads	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland

Tabelle 5: Für die magnetische Zellseparation verwendete anti-Maus Antikörper.

<i>Antigen</i>	<i>Fluorochrom</i>	<i>Klon</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Ort</i>
CD11b	APC Fire 750	M1/70	BioLegend	San Diego, Kalifornien, USA
CD11c	PE Dazzle 594	N418	BioLegend	San Diego, Kalifornien, USA
CD25	PE	PC61	BioLegend	San Diego, Kalifornien, USA
CD3	FITC	17A2	BioLegend	San Diego, Kalifornien, USA
CD4	PE Dazzle 594	RM4-5	BioLegend	San Diego, Kalifornien, USA
CD45.1	AF700	A20	BioLegend	San Diego, Kalifornien, USA
CD45.1	APC	A20	BioLegend	San Diego, Kalifornien, USA
CD45.2	PE	104	BioLegend	San Diego, Kalifornien, USA
CD8	V450	53-6.7	BD Biosciences	Franklin Lakes, New Jersey, USA
Foxp3	APC	FJK-16s	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Ly6C	AF488	HK1.4	BioLegend	San Diego, Kalifornien, USA
Ly6G	BV421	1A8	BioLegend	San Diego, Kalifornien, USA

Tabelle 6: Für Durchflusszytometrien verwendete Fluorochrom-gekoppelte anti-Maus Antikörper.

2.1.6. Kits

<i>Kit</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Ort</i>
Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Mouse IL-6 DuoSet ELISA	R&D Systems	Minneapolis, Minnesota, USA

Tabelle 7: Verwendete Kits.

2.1.7. Software

<i>Software</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Ort</i>
BD FACSDiva Software 8.0	BD Biosciences	Franklin Lakes, New Jersey, USA
Citavi	Swiss Academic Software	Wädenswil, Schweiz
i-control	Tecan Group	Männedorf, Schweiz
ImageJ	Rasband, W.S. (National Institute of Health)	Bethesda, Maryland, USA
Microsoft 365	Microsoft	Redmond, Washington, USA
Prism 10	GraphPad Software	Boston, Massachusetts, USA

Tabelle 8: Verwendete Software.

2.2. Methoden

2.2.1. Mäuse

Alle in Tierversuchen und für Organentnahmen eingesetzten Mäuse wurden in den Einrichtungen der Forschungstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter spezifisch-pathogenfreien Bedingungen geboren und gehalten. Den Tieren standen autoklaviertes Leitungswasser und, sofern nicht im Einzelnen abweichend beschrieben, pelletiertes Standardfutter ad libitum zur Verfügung. Sämtliche Tierversuche wurden der zuständigen Hamburger Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz vorab angezeigt und von ihr genehmigt (Tierversuchsantrag G53/15).

Versuchstiere wurden durch intraperitoneale Injektion eines Mischpräparates von Ketamin und Xylazin final anästhesiert (Ketamin 35,7 mg/ml und Xylazin 5,7 mg/ml in Trägerlösung PBS, körpergewichtsadaptierte Dosierung von 10 µl/g) und durch zervikale Dislokation sicher getötet. Organentnahmen erfolgten anschließend am toten Tier.

Alle Tiere hatten C57BL/6 Hintergrund. Konditionelle Ahr-Knockouts wurden mittels des Cre-loxP-Systems erzeugt, dafür wurden die in Tabelle 9 aufgelisteten Mauslinien verwendet. Das konditionelle Ahr-Allel von B6.Cg-Ahr^{tm3.1Bra}/J Tieren entstammt Mäusen mit dem Allel Ahr^d, dessen Genprodukt niedrigere Liganden-Affinität aufweist als das in C57BL/6 kongenitale Ahr^{b-1} (Poland et al. 1994). B6.Cg-Ahr^{tm3.1Bra}/J Tiere mit homozygot loxP-flankiertem Ahr-Allel wurden mit Tieren verpaart, die hemizygot für Cre unter einem geeigneten gewebespezifischen Promoter waren. Jene Nachkommen, die heterozygot für das loxP-flankierte Ahr-Allel und hemizygot für das jeweilige Cre-Transgen waren, wurden erneut mit B6.Cg-Ahr^{tm3.1Bra}/J Mäusen verpaart, um die in Tabelle 10 aufgelisteten Genotypen mit homozygot loxP-flankiertem Ahr-Allel und hemizygotem Cre-Transgen unter gewebespezifischem Promoter zu erzeugen (Hepatozyten: Ahr^{ΔAlb}, Endothelzellen: Ahr^{ΔCdh5}, Dendritische Zellen: Ahr^{ΔItgax}, Myeloische Zellen: Ahr^{ΔLysM}). Wurfgeschwister mit homozygot loxP-flankiertem Ahr-Allel ohne Cre (Ahr^{fl/fl}) dienten als Kontrollen.

Bezeichnung	Charakteristika
B6.Cg-Ahr ^{tm3.1Bra} /J	Homozygot loxP-flankiertes Ahr-Allel
B6.Cg-Speer6 ^{ps1Tg(Alb-cre)21Mgn} /J	Hemizygot für Cre unter dem Albumin-Promoter (Hepatozyten-spezifisch)
B6.FVB-Tg(Cdh5-cre)7Mlia/J	Hemizygot für Cre unter dem Cadherin-5-Promoter (Endothelzellen-spezifisch)
B6.Cg-Tg(Itgax-cre)1-1Reiz/J	Hemizygot für Cre unter dem Integrin α-X-Promoter (spezifisch für dendritische Zellen)
B6.129P2-Lyz2 ^{tm1(cre)Ifo} /J	Hemizygot für Cre unter dem Lysozym M-Promoter (spezifisch für myeloische Zellen)

Tabelle 9: Für die Erzeugung konditioneller Ahr-Knockouts verwendete Mauslinien.

<i>Kurzbezeichnung</i>	<i>Charakteristika</i>
Ahr ^{ΔAlb}	Konditioneller Ahr-Knockout in Hepatozyten (homozygot loxP-flankiertes Ahr-Allel, heterozygot für Cre unter dem Albumin-Promoter)
Ahr ^{ΔCdh5}	Konditioneller Ahr-Knockout in Endothelzellen (homozygot loxP-flankiertes Ahr-Allel, heterozygot für Cre unter dem Cadherin-5-Promoter)
Ahr ^{ΔItgax}	Konditioneller Ahr-Knockout in dendritischen Zellen (homozygot loxP-flankiertes Ahr-Allel, heterozygot für Cre unter dem Integrin α-X-Promoter)
Ahr ^{ΔLysM}	Konditioneller Ahr-Knockout in myeloischen Zellen (homozygot loxP-flankiertes Ahr-Allel, heterozygot für Cre unter dem Lysozym M-Promoter)
Ahr ^{fl/fl}	Cre-negative Wurfgeschwister der oben Genannten (homozygot loxP-flankiertes Ahr-Allel, ohne Cre)

Tabelle 10: Verwendete Mauslinien mit konditionellen Ahr-Knockouts in Leberzellen.

Ferner wurden Mäuse mit komplettem Mdr2-Knockout und konditionellem Ahr-Knockout in Leberzellen generiert: Aus Verpaarung von FVB.129P2-Abcb4^{tm1Bor/J} (Mdr2^{-/-}) Mäusen mit Ahr^{ΔAlb}, Ahr^{ΔCdh5}, Ahr^{ΔItgax} oder Ahr^{ΔLysM} Tieren gingen in zweiter Filialgeneration Tiere hervor, die Mdr2-defizient mit homozygot loxP-flankiertem Ahr-Allel und hemizygotem Cre-Transgen waren im Sinne eines konditionellen Ahr-Knockouts in Hepatozyten (Mdr2^{-/-} Ahr^{ΔAlb}), Endothelzellen (Mdr2^{-/-} Ahr^{ΔCdh5}), dendritischen Zellen (Mdr2^{-/-} Ahr^{ΔItgax}) oder myeloischen Zellen (Mdr2^{-/-} Ahr^{ΔLysM}). Wurfgeschwister ohne Ahr-Knockout (Mdr2^{-/-} Ahr^{fl/fl}) dienten als Kontrollen (Tabelle 11).

<i>Kurzbezeichnung</i>	<i>Charakteristika</i>
Mdr2 ^{-/-} Ahr ^{ΔAlb}	Kompletter Mdr2-Knockout und konditioneller Ahr-Knockout in Hepatozyten
Mdr2 ^{-/-} Ahr ^{ΔCdh5}	Kompletter Mdr2-Knockout und konditioneller Ahr-Knockout in Endothelzellen
Mdr2 ^{-/-} Ahr ^{ΔItgax}	Kompletter Mdr2-Knockout und konditioneller Ahr-Knockout in dendritischen Zellen
Mdr2 ^{-/-} Ahr ^{ΔLysM}	Kompletter Mdr2-Knockout und konditioneller Ahr-Knockout in myeloischen Zellen
Mdr2 ^{-/-} Ahr ^{fl/fl}	Wurfgeschwister der oben Genannten mit komplettem Mdr2-Knockout ohne konditionellen Ahr-Knockout

Tabelle 11: Verwendete Mauslinien mit Mdr2-Knockout und konditionellen Ahr-Knockouts in Leberzellen.

Im Folgenden sind alle weiteren in dieser Arbeit verwendeten Mauslinien aufgelistet (Tabelle 12):

<i>Kurzbezeichnung</i>	<i>Charakteristika</i>
C57BL/6J	Hintergrund aller verwendeten Mauslinien
K14-OVAp	Vollständige Bezeichnung: B6.Cg-Tg(K14-OVAp) ^{Khog} /J Konditionelle Expression des SIINFEKL-Peptids in Epithelzellen (unter dem Keratin 14-Promoter) (McGargill et al. 2002)
OT-1	Vollständige Bezeichnung: C57BL/6-Tg(TcraTcrb)1100Mjb/J Expression eines transgenen SIINFEKL-spezifischen T-Zell-Rezeptors
B6.SJL	Vollständige Bezeichnung: B6.SJL-Ptprc ^a Pepc ^b /BoyJ Expression von CD45.1 anstatt CD45.2
2D2	Vollständige Bezeichnung: C57BL/6-Tg(Tcra2D2,Tcrb2D2)1Kuch/J Expression eines Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein-spezifischen T-Zell-Rezeptors
Mdr2 ^{-/-}	Vollständige Bezeichnung: FVB.129P2-Abcb4 ^{tm1Bor} /J Chronisch toxische Cholangitis durch beeinträchtigte biliäre Phospholipid-Sekretion

Tabelle 12: Verwendete Mauslinien ohne konditionelle Ahr-Knockouts.

2.2.2. DDC-Fütterung

Fütterung von DDC verursacht in Mäusen eine cholestatische Lebererkrankung mit sklerosierender Cholangitis (Fickert et al. 2007). Standardfutter in Pulverform wurde mit 0,1 % DDC vermischt, mit Leitungswasser hydriert und händisch zu einem Teig geknetet. Auf einem Alufolie-bespannten Karton wurden runde circa 10 cm durchmessende, bis zu circa 5 mm starke Plättchen geformt und unter dem Abzug luftgetrocknet. Am Folgetag wurden die Plättchen gewendet und nach weiterer ein- bis zweitägiger Trocknung verfüttert. Die Futterspender und Käfigräume wurden vollständig von Standardfutter bereinigt, während der Dauer des Versuches wurde den Tieren zur Induktion einer Cholangitis stattdessen ausschließlich das 0,1 % DDC-haltige Futter ad libitum bereitgestellt.

2.2.3. K14-OVAp-Modell

Das K14-OVAp-Mausmodell ist durch eine CD8⁺ T-Zell-vermittelte akute Cholangitis gekennzeichnet (Schwinge et al. 2015). CD8⁺ T-Zellen wurden mittels magnetisch aktivierter Zellsortierung (MACS) aus Milzen von OT-1 Mäusen isoliert und in PBS auf eine Zelldichte von 10⁶ / ml eingestellt. Jeweils 100 µl (entsprechend 10⁵ Zellen) wurden 12 bis 14 Wochen alten K14-OVAp Mäusen in die Schwanzvene injiziert. Die Tiere wurden anschließend klinisch beobachtet und täglich gewogen. 5 d nach dem Zelltransfer wurden die Tiere getötet, Vollblut, Leber und Milz wurden entnommen.

2.2.4. Mdr2^{-/-}-Modell

Mdr2 transportiert biliäre Phospholipide aus Hepatozyten in die Galle, welche die Gallenwege durch Bildung gemischter Mizellen mit Gallensäuren schützen. Mdr2^{-/-} Mäuse zeigen aufgrund erhöhter intraduktaler Konzentrationen freier Gallensäuren eine chronisch progrediente sklerosierende Cholangitis (Fickert et al. 2004). In dieser Arbeit wurden Mdr2^{-/-} Mäuse zum einen kurzfristig systemisch mit dem Ahr-Agonisten ITE behandelt und zum

anderen wurden Mäuse mit komplettem Mdr2-Knockout und konditionellem Ahr-Knockout in Leberzellen erzeugt und nach längeren Zeiträumen analysiert.

Zur Behandlung mit ITE wurden Mdr2^{-/-} Mäusen dreimal in Abständen von 48 h 200 µg ITE oder als Vehikelkontrolle 50 µl Maisöl intraperitoneal (i.p.) appliziert. 24 h nach der letzten Gabe wurden die Tiere getötet, die Serum-Transaminasenaktivitäten bestimmt, NPCs der Leber und Milz durchflusszytometrisch analysiert und es wurden histologische Präparate der Leber angefertigt.

Tiere mit Mdr2-Knockout und konditionellem Ahr-Knockout in Leberzellen (Tabelle 11) wurden unter Standardbedingungen gehalten und nach vier, acht oder zwölf Lebenswochen getötet, um Serum-Transaminasenaktivitäten zu bestimmen und histologische Präparate der Leber anzufertigen.

2.2.5. Leberperfusion und Leberentnahme

Nach Tötung durch finale Anästhesie und zervikale Dislokation wurde die Maus in Rückenlage an Vorder- und Hinterläufen auf dem Sektionstisch fixiert. Die Bauchhaut wurde mit Flächendesinfektionsmittel desinfiziert. Zunächst wurden Fell, Haut und Bauchdeckenmuskulatur mit transversalen bilateralen Schereninzisionen auf Ebene des Nabels und von diesem Schnitt ausgehend einer medianen longitudinalen Inzision bis substernal durchtrennt, dann wurde das Peritoneum eröffnet. Magen und Darmschlingen wurden nach links beiseitegeschoben, um die Leberpforte zu exponieren. Die Pfortader wurde circa 1 cm distal der Leberpforte mit einer 27 Gauge Kanüle, welche über einen Silikonschlauch an eine ausgeschaltete Rollenpumpe mit dem Perfusionsmedium angeschlossen war, punktiert.

Anschließend wurde die Vena cava inferior im Bereich der Mündungen der Venae renales mit der Schere eröffnet. Das austretende Vollblut wurde gegebenenfalls mit einer 1 ml Spritze aus dem Peritonealraum aspiriert und zur Aufbereitung in 1 ml Reaktionsgefäße überführt oder mit Zellstofftüchern aufgesaugt und verworfen. Für die Perfusion wurde die Rollenpumpe mit einer konstanten Flussrate von circa 15 ml/min so lange betrieben, bis das Organ peripher weitestmöglich blutleer war. Währenddessen aus der Vena cava inferior austretende Flüssigkeit wurde mit Zellstofftüchern aufgesaugt und verworfen. Als Perfusionsmedium wurde für die Isolation von LSECs Kollagenasepuffer verwendet, ansonsten PBS.

Die Gallenblase wurde mit einer anatomischen Pinzette gefasst, mit der Schere abgesetzt und verworfen. Schließlich wurden die aufhängenden Bänder der Leber und die Strukturen der Leberpforte abgesetzt und das Organ entnommen.

2.2.6. Aufbereitung von Vollblut und Messung von Transaminasenaktivitäten

Vollblut wurde unmittelbar nach Eröffnen der Vena cava inferior (vor eventueller Leberperfusion) mit einer 1 ml Spritze aus der Bauchhöhle aspiriert und in ein 1 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach mindestens 30 min Inkubation bei Raumtemperatur zur Koagulation wurde das Vollblut für 10 min bei 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1 ml Reaktionsgefäß überführt und ebenfalls für 10 min bei 3000 g zentrifugiert. Das gewonnene Serum wurde in 100 µl Reaktionsgefäße aufgeteilt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die Messung der Serum-Transaminasenaktivitäten wurde freundlicherweise von den technischen Assistentinnen und Assistenten des Instituts für Experimentelle Hepatologie und

Immunologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Institutsdirektorin Professorin Gisa Tiegs) mit einem Cobas Integra 400 Plus (Roche) durchgeführt. Bei -80 °C aufbewahrtes Serum wurde auf Eis aufgetaut. 25 µl Serum wurden mit 100 µl Aqua dest. verdünnt, in entsprechende Testgefäße überführt und den Kolleginnen und Kollegen übergeben. Die Messergebnisse wurden tabellarisch in Microsoft Excel-kompatiblen Dateiformat bereitgestellt.

2.2.7. Aufbereitung von Lebergewebe für die Durchflusszytometrie

Für die Aufreinigung von NPCs der Leber ohne anschließende MACS wurde die Leber mit PBS perfundiert. Es wurde entweder das gesamte Organ verarbeitet oder (bei gleichzeitiger Präparation des Lobus sinister medialis hepatis für die Formalin-Fixation, des Lobus dexter medialis für die Kryofixation oder von Anteilen des Lobus dexter medialis für die RNA-Isolation) der verbleibende größte Teil (anatomische Bezeichnungen nach Komárek 2012). Bis zur Verarbeitung wurde das Gewebe in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen in 1 ml PBS auf Eis gekühlt. Alle Arbeitsschritte erfolgten anschließend bei Raumtemperatur mit raumwarmen Geräten und Reagenzien.

Das Lebergewebe wurde mit der Daumenaufgabe des Kolbens einer 2 ml Spritze durch ein 100 µm Zellsieb in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen passiert. Das Sieb wurde dabei mit PBS gespült. Aus der Suspension sollten zunächst die Hepatozyten sedimentiert werden: Die Suspension wurde mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und für 4 min bei 40 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, erneut aufgefüllt und für 4 min bei 40 g zentrifugiert, der Überstand wieder in ein neues Röhrchen überführt. Die Sedimente aus beiden Zentrifugationsschritten wurden verworfen. Zur Konzentration der NPCs wurde die Suspension für 7 min bei 400 g zentrifugiert, der Überstand mit einer 50 ml Pipette aspiriert und verworfen.

Anschließend wurden die NPCs mittels Iodixanol-Dichtegradientenzentrifugation angereichert. Das Pellet wurde mit einer 5 ml Pipette in wenig PBS suspendiert und anschließend mit PBS auf genau 4,5 ml aufgefüllt. Die gesamte Zellsuspension wurde in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 2,5 ml Iodixanol-haltigem Dichtegradientenmedium vermischt, mit 1 ml PBS überschichtet und für 20 min bei 400 g ohne Bremse zentrifugiert. Die NPCs sollten entsprechend der Dichtegradienten der Suspensionsbestandteile zwischen der klaren PBS- und der schlierigen Iodixanol-Lösungs-Phase in einer schmalen weißlich-wolkigen Intermediärphase angereichert worden sein. Diese wurde mit einer 1 ml Eppendorf-Pipette vollständig aspiriert und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Suspension wurde mit PBS auf 15 ml aufgefüllt und für 5 min bei 400 g zentrifugiert, der Überstand wurde mit einer 20 ml Pipette aspiriert und verworfen.

2.2.8. Aufbereitung von Lebergewebe für Zellkulturen

Für die Isolation von LSECs und DCs wurde die Leber mit 37 °C warmem Kollagenasepuffer perfundiert. Das Organ wurde vollständig verarbeitet und nach Perfusion und Entnahme bis zur weiteren Verarbeitung in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen in 1 ml GBSS auf Eis gekühlt. Bei Entnahme von Lebern aus mehreren Versuchstieren des identischen Genotyps oder bis auf das Geschlecht identischer Genotypen wurden diese zusammengeführt und zusammen verarbeitet.

Das Organ wurde mit einer anatomischen Pinzette in eine Petrischale überführt, darin an der Leberpforte gefasst und mit einem Skalpell zerschabt. Der entstehende grobe Brei wurde in wenigen ml Kollagenasepuffer aufgeschwemmt und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, mit Kollagenasepuffer aufgefüllt, mit 50 µl DNase I (1.000 U/ml) versetzt und für 25 min bei 37 °C unter starkem Schütteln inkubiert.

Die grobe Suspension wurde durch ein 100 µm Zellsieb in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Größere Gewebestücke wurden mit der Daumenaufgabe des Kolbens einer 2 ml Spritze durch das Sieb passiert. Das Sieb wurde dabei mit PBS gespült. Wie bei der Aufbereitung von Lebergewebe für die Durchflusszytometrie (siehe 2.2.7) sollten zuerst die Hepatozyten sedimentiert, anschließend die NPCs konzentriert werden: Die Suspension wurde zweimal, jeweils nach Auffüllen mit PBS auf 50 ml, anschließendem Überführen des Überstandes in ein neues Zentrifugenröhrchen und Verwerfen des Sediments, für 4 min bei 40 g zentrifugiert, anschließend für 7 min bei 400 g. Der Überstand wurde mit einer 50 ml Pipette aspiriert und verworfen.

Die NPCs wurden mittels Iodixanol-Dichtegradientenzentrifugation angereichert. Das Pellet wurde mit einer 5 ml Pipette in wenig PBS suspendiert und die Suspension auf genau 5 ml aufgefüllt. Wurden mehr als zwei Organe gepoolt, so wurde die Suspension auf 5 ml PBS je zwei Organe eingestellt plus weitere 5 ml bei ungerader Anzahl. Jeweils 5 ml der Suspension wurde in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 2 ml Iodixanol-haltigem Dichtegradientenmedium vermischt, aus einer 1 ml Eppendorf-Pipette mit 1 ml PBS überschichtet und für 20 min bei 400 g ohne Bremse zentrifugiert. Die NPCs sollten entsprechend Dichtegradienten der Suspensionsbestandteile zwischen der klaren PBS- und der schlierigen Iodixanol-lösungs-Phase in einer schmalen weißlich-wolkigen Intermediärphase angereichert worden sein. Diese wurde mit einer 1 ml Eppendorf-Pipette vollständig aspiriert und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Aus mehr als zwei Organen (folglich mit Dichtegradientenzentrifugation in separaten Röhrchen) angereicherte NPCs wurden in diesem Schritt wieder zusammengeführt. Die Suspension wurde mit PBS auf 15 ml aufgefüllt und für 5 min bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer 20 ml Pipette aspiriert und verworfen.

LSECs wurden anschließend mittels MACS anhand des Oberflächenmarkers CD146 isoliert, DCs anhand CD11c.

2.2.9. Milzentnahme und Herstellung von Milz-Einzelzellsuspensionen

Wurde der Maus zuvor bereits die Leber entnommen, so wurde die Milz über den etablierten ventralen Zugang mit der anatomischen Pinzette gefasst, mit der chirurgischen Schere abgesetzt und entnommen. Für die alleinige Entnahme der Milz wurde das getötete Tier in Rechtsseitenlage auf dem Sektionstisch platziert. Die Bauchhaut wurde mit Flächendesinfektionsmittel desinfiziert. Zunächst wurden Fell, Haut und Bauchdeckenmuskulatur der seitlichen Bauchregion subkostal mit einer circa 2 cm langen longitudinalen Schereninzision durchtrennt, dann wurde das Peritoneum eröffnet. Die Milz wurde mit der anatomischen Pinzette stumpf freipräpariert, mit der chirurgischen Schere abgesetzt und entnommen.

Das Organ wurde mit der Daumenaufgabe des Kolbens einer 2 ml Spritze durch ein 100 µm Zellsieb in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen passiert, das Sieb dabei mit PBS gespült. Die Sus-

pension wurde mit PBS auf 30 ml aufgefüllt und für 5 min bei 400 g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Um Erythrozyten zu lysieren, wurde das Pellet in 1 ml Ammoniumchlorid-Kalium-Puffer suspendiert und für 45 s inkubiert. Die Lyse wurde durch Verdünnung mit PBS auf 20 ml gestoppt, die Suspension durch ein 40 µm Zellsieb in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet je nach Verwendungszweck in PBS oder in MACS-Puffer suspendiert.

2.2.10. Mikroskopische Zellzahlbestimmung

Die Dichte vitaler mononukleärer Zellen in Suspensionen wurde in einer Neubauer improved-Zählkammer bestimmt.

Ein Aliquot der Suspension wurde in Trypanblaulösung (Lebend-Tot-Färbung) verdünnt. In der Regel wurden Leberzellsuspensionen und MACS-sortierte Zellsuspensionen zehnfach verdünnt, Milzzellsuspensionen durch serielle Verdünnung einhundertfach. 10 µl der verdünnten Suspension wurden in die Zählkammer pipettiert. Unter dem Phasenkontrastmikroskop wurde die Anzahl vor blauem Hintergrund weißer (vitaler) mononukleärer Zellen in zwei Kammerquadranten bestimmt. Die Zelldichte ZD der f-fach verdünnten Stammlösung mit n gezählten Zellen in zwei Quadranten bei einem Kammervolumen von 100 nl betrug $ZD = (f * n/2) / (10^{-4} \text{ ml})$.

2.2.11. Magnetische Zellseparation

Mittels magnetischer Zellseparation (MACS) wurden suspendierte Zellen anhand von Oberflächenantigenen sortiert. Die Zielzellen wurden dabei mit Antikörper-beschichteten paramagnetischen Partikeln (MACS-Beads) markiert, um sie in einer vorübergehend magnetisierten ferromagnetischen Matrix einer Durchflusssäule selektiv binden zu können. Das Verfahren ermöglicht daher Positiv- und Negativsortierung.

Die MACS wurde in dieser Arbeit zur Separation von LSECs, DCs, CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen (jeweils Positivsortierungen) und CD4⁺CD25⁻ T-Zellen (CD25-Negativsortierung mit nachfolgender CD4-Positivsortierung) verwendet. Der MACS von LSECs mittels CD146-MACS-Beads und Leber-DCs mit CD11c-MACS-Beads gingen eine Leberperfusion mit Kollagenase-Puffer und eine Dichtegradientenzentrifugation voraus. CD4⁺ und CD8⁺ Zellen wurden mit den entsprechenden MACS-Beads aus Milz-Einzelzellsuspensionen sortiert. CD4⁺CD25⁻ Zellen wurden durch Markierung CD25⁺ Zellen mit entsprechendem Phycoerythrin- (PE) konjugiertem Antikörper, Negativsortierung mit PE-MACS-Beads und anschließender Positivsortierung mit CD4-MACS-Beads isoliert. Es wurde jeweils nach Herstellerprotokollen (Miltenyi Biotec) vorgegangen. Für die Depletion CD25⁺ Zellen wurden abweichend davon ebenfalls LS-Säulen verwendet und vor der magnetischen Markierung von LSECs erfolgte unmittelbar vor Zugabe der CD146-MicroBeads ein Fc-Rezeptorblock durch Zugabe von 1 µl anti-Maus CD16/32-Antikörper pro 10⁷ Zellen und Inkubation für 10 min bei 4 °C.

2.2.12. Kultur von LSECs

LSECs wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation und MACS anhand des Oberflächenmarkers CD146 isoliert. Die Suspension mit den magnetisch markierten Zellen wurde mit PBS auf 15 ml aufgefüllt und für 7 min bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das LSEC-Pellet in 1 ml Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), supplementiert mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS), 100 U/l Penicillin und 0,1 mg/l Streptomycin (Pen/Strep), suspendiert, die Zelldichte mikroskopisch bestimmt und durch weitere Verdünnung mit Medium eingestellt.

Die Zellen wurden auf kollagenisierten 96-Well Zellkulturplatten gesät. Für die Kollagenisierung wurden die Platten vorab für mehrere Stunden bei 37 °C mit 50 µl Kollagen-Lösung (0,2 mg/ml in PBS) je Well inkubiert und mehrfach mit PBS gewaschen. Nach Kultur über Nacht wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und mit frischem Medium überschichtet.

2.2.13. In vitro LPS-Stimulation und quantitative IL-6-Messung

Die Abhängigkeit der Endotoxintoleranz von LSECs vom Ahr wurde in vitro an Zellen mit und ohne Ahr-Knockout und Behandlungen mit Ahr-Agonisten oder einem Antagonisten untersucht. Die Zellen wurden LPS exponiert, anschließend wurde die IL-6-Konzentration im Kulturüberstand gemessen.

LSECs wurden am Vortag mittels MACS isoliert und über Nacht vorkultiviert (C57BL/6 Wildtyp: $1 \cdot 10^5$ / Well; Ahr^{fl/fl}: $1 \cdot 10^5$ / Well; Ahr^{ΔCdh5}: $1,25 \cdot 10^5$ / Well) und anschließend für 20 h mit 1 µg/ml LPS oder Vehikel (PBS) und den Ahr-Agonisten ITE, FICZ, L-Kyn (Vehikel jeweils DMSO 0,4 %), TCDD (Vehikel Toluol 0,32 %), dem Ahr-Antagonisten CH223191 (Vehikel DMSO 0,4 %) oder Vehikel in IMDM (10 % FCS, Pen/Strep) inkubiert. Um eine vergleichbare Konfluenz der LSECs zu Beginn der Stimulationen zu gewährleisten, wurden die LSECs aus Ahr^{ΔCdh5} dichter ausgesät, da sie im Vergleich zu den Kontrollzellen schlechter anwuchsen.

Nachfolgend wurde IL-6 in Zellkulturüberständen durch einen Enzym-gekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA) quantitativ nachgewiesen: Ein an der Platte adhärierender Antikörper (Capture Antikörper) immobilisiert das Antigen, ein weiterer Antikörper (Detection Antikörper) bindet ein zweites Zielepitop (Sandwich ELISA). Im hier verwendeten Kit (R&D Systems DuoSet) dienen als Nachweisplattform biotinylierte Detection Antikörper und biolumineszente Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugate.

Es wurde nach Herstellerprotokoll vorgegangen. Zellkulturüberstände wurden unverdünnt auf beschichtete 96-Well Platten aufgetragen. Die Auslesung erfolgte mit einem Tecan F50 Mikroplatten-Reader und zugehöriger Software i-control (jeweils Tecan Group).

2.2.14. In vitro Treg-Konversionsassay

Die Fähigkeit von LSECs und DCs mit und ohne Ahr-Knockout, in vitro CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs zu induzieren, wurde durch Kokultur mit CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus 2D2 Mäusen mit transgenem Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein- (MOG-) Peptid-spezifischem T-Zell-Rezeptor und nachfolgender Durchflusszytometrie untersucht.

LSECs wurden am Vortag mittels MACS isoliert und über Nacht vorkultiviert, DCs aus Lebern und Milzen wurden unmittelbar zur Kokultur mittels MACS isoliert. Aus Milzen von 2D2 Mäusen wurden CD4⁺CD25⁻ T-Zellen mittels MACS isoliert. Für den Konversionsassay wurden vorkultivierte LSECs (C57BL/6 Wildtyp: $1 \cdot 10^5$ / Well; Ahr^{fl/fl}: $1 \cdot 10^5$ / Well; Ahr^{ΔCdh5}: $1,25 \cdot 10^5$ / Well) oder frisch isolierte DCs aus Lebern oder Milzen (jeweils $5 \cdot 10^4$ / Well) mit 2D2 CD4⁺CD25⁻ T-Zellen ($5 \cdot 10^5$ / Well) in Serum-freiem Panserin-Medium, supplementiert mit Pen/Strep, 2 ng/ml TGF-β und 1 μg/ml MOG-Peptid, für vier Tage kulturell kultiviert.

Die T-Zellen wurden anschließend durch vorsichtiges Auf- und Ab-Pipettieren der Zellsuspension geerntet und durchflusszytometrisch auf Expression von CD3, CD4, CD25 und Foxp3 untersucht.

2.2.15. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient der Einzelzellanalyse in Zellsuspensionen. Suspendierte Zellen werden in laminarem Fluss einzeln an einem Laser vorbeigeführt, anhand ihrer Lichtbrechung können Größe und Granularität relativ gemessen werden. Darüber hinaus können fluoreszente Farbstoffe mit diskreten Emissionsspektren separat detektiert werden. So können weitere Eigenschaften erfasst werden, insbesondere die Dichten extra- und intrazellulärer Zielstrukturen durch Markierungen mit unterschiedlichen Fluorochrom-konjugierten Antikörpern. Im allgemeinen Sprachgebrauch und in dieser Arbeit werden auch Fluoreszenz-aktivierte Zytometrien ohne Zellsortierung als Fluorescence-activated cell sorting (FACS) bezeichnet.

Sofern nicht anders angegeben, erfolgten alle Inkubationsschritte und Zwischenlagerungen bei 4 °C in Dunkelheit, Waschungen durch Zugabe von 1 ml PBS und Zentrifugation bei 400 g für 5 min.

Zuerst wurden tote Zellen mit Pacific Orange N-Hydroxysuccinimid-Ester (PacO-NHS) angefärbt: PacO-NHS dringt in Zellen mit aufgehobener Membranintegrität ein und reagiert intrazellulär mit primären Amingruppen von Proteinen und DNA, um stabile Amidbindungen einzugehen. Intakte Zellmembranen lebender Zellen sind hingegen impermeabel für den Farbstoff. Die Zellen wurden in wenig PBS suspendiert, in einem FACS-Röhrchen auf circa 10^6 Zellen in 200 μl PacO-NHS (1:1000 in PBS) eingestellt, für 20 min inkubiert und anschließend gewaschen.

Für Markierungen von Oberflächenantigenen wurden die zugehörigen Fluorochrom-konjugierten Antikörper in einer gemeinsamen Stammlösung in MACS-Puffer auf Gebrauchskonzentrationen von jeweils 1 μl / 100 μl Puffer verdünnt. Das Zellpellet wurde in 100 μl der Stammlösung suspendiert und für 15 min inkubiert. Nach erneuter Waschung wurden die gefärbten Zellen – sofern keine Foxp3-Färbung angeschlossen wurde – durch Suspension und Inkubation in Paraformaldehyd (4 % in PBS) für 15 min fixiert, erneut gewaschen und in PBS suspendiert. Die FACS-Analyse fand in der Regel am folgenden Tag statt.

Das intranukleäre Foxp3 wurde mit dem Foxp3 Staining Buffer Set (Thermo Fisher Scientific) im Anschluss an die Oberflächenantigenfärbung (ohne Paraformaldehyd-Fixierung) angefärbt. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurden die Zellen in 100 μl (statt 1 ml) der „Fixation/Permeabilization working solution“ behandelt und mit jeweils 500 μl (statt 2 ml)

„1X Permeabilization Buffer“ gewaschen. Fc-Rezeptoren wurden durch Inkubation mit 0,2 µl anti-Maus CD16/32-Antikörper für 15 min geblockt. Die Färbung erfolgte durch Zugabe von 1 µl Foxp3-Antikörper und Inkubation über Nacht. Die Zellen wurden anschließend erneut gewaschen („1X Permeabilization Buffer“), in PBS suspendiert und per FACS analysiert.

Die FACS erfolgte mit dem Durchflusszytometer LSR II und zugehöriger Software BD FACSDiva (jeweils BD Biosciences). Für Kompensationen überlappender Fluoreszenzspektren wurden für Fluorochrom-konjugierte Antikörper OneComp eBeads (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerprotokoll verwendet, für PacO-NHS wurden thermisch abgetötete (56 °C für 30 min) Splenozyten verwendet.

FACS-Daten wurden in BD FACSDiva mittels Gating in zweidimensionalen Punktdiagrammen ausgewertet. Einzelzellen wurden über die Vorwärtsstreuung identifiziert und eingeschlossen, Zelltrümmer über ihre geringe Vorwärtsstreuung und tote Zellen anhand PacO-NHS-Färbung ausgeschlossen. Anschließend erfolgten Gatings nach Antikörper-Fluorochrom-Konjugaten (Abbildung 3).

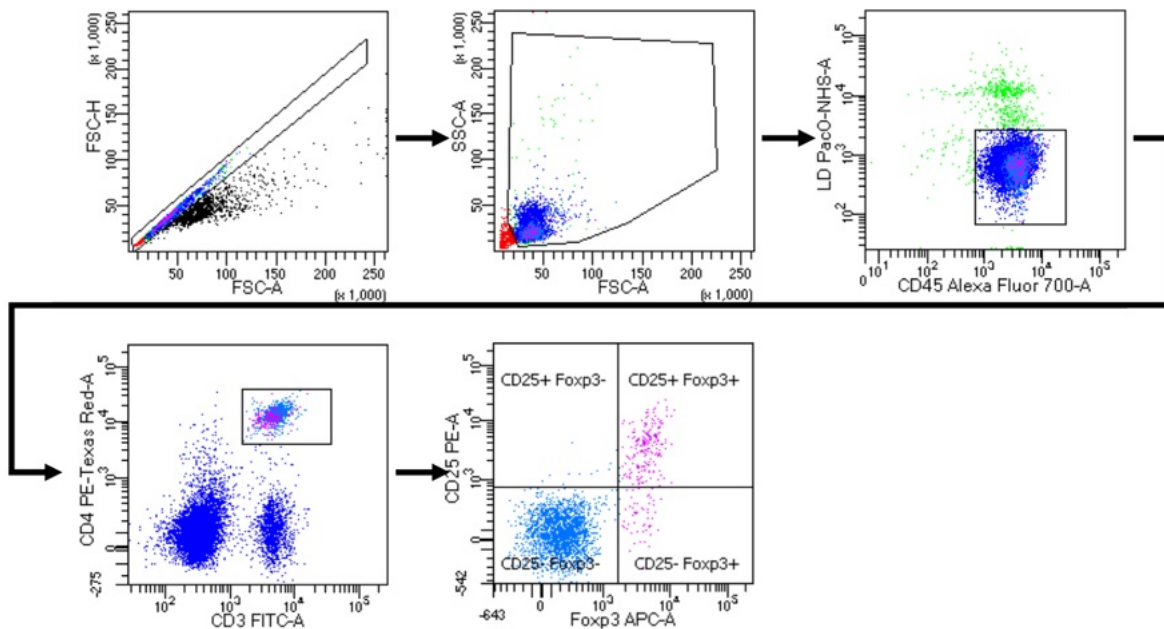


Abbildung 3: Exemplarisches Gating bei Fluoreszenz-aktivierter Durchflusszytometrie. Schrittweise wurden Einzelzellen über die Vorwärtsstreuung identifiziert (maximale Signalstärke FSC-H und summierte Signalstärke FSC-A), Zelltrümmer (rot) anhand geringer Vorwärtsstreuung ausgeschlossen, CD45⁺ und lebende Zellen (fehlende PacO-NHS-Aufnahme), CD3⁺CD4⁺ und schließlich CD25⁺Foxp3⁺ Zellen (oberer rechter Quadrant) identifiziert.

2.2.16. Fixierung und histologische Färbung von Lebergewebe

Für die Präparation von Formalin-fixiertem Paraffin-eingebettetem (FFPE) Lebergewebe wurde der Lobus dexter medialis (Nomenklatur nach Komárek 2012) aus in situ mit PBS perfundierten Organen verwendet. Der Lappen wurde mit der Schere abgesetzt, in eine Einbettkassette überführt und über Nacht in Formalin 4 % bei Raumtemperatur inkubiert.

Das fixierte Präparat wurde freundlicherweise durch die technischen Assistentinnen und Assistenten des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf automatisch entwässert und paraffiniert. Anschließend wurde es mit der ventralen Oberfläche

zur Schnittfläche in einen Paraffinblock eingebettet. Der erstarrte Block wurde bis zum Zugschnitt bei Raumtemperatur gelagert. Zur Herstellung von Paraffinschnitten am Mikrotom wurde das FFPE-Präparat zunächst bis ins Parenchym getrimmt, anschließend wurden Serien 3 µm starker Schnitte angefertigt, in ein Streckbad überführt und zu je einem oder zwei Schnitten auf Objektträgern aufgenommen. Die Objektträger wurden für mehrere Stunden bei 37 °C oder über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend bei Raumtemperatur gelagert. Zur histologischen Färbung wurden die Präparate durch dreimalige Immersion in Xylol für jeweils 3 min deparaffiniert und anschließend in der absteigenden Ethanolreihe hydriert (90 %, 70 %, 50 %, 0 % für jeweils 3 min).

Für Hämatoxylin-Eosin- (HE) Färbungen wurden die Gewebeschnitte für 15 min in Hämatoxylin inkubiert, mit Leitungswasser gespült und für weitere 15 min unter fließendem Leitungswasser belassen („Bläuung“). Anschließend wurden die Schnitte für 1 min in Eosin gefärbt, mit Leitungswasser gespült und in der aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert (zweimaliges kurzes Eintauchen in 50 %, 70 % für 30 s, 90 % für 1 min, zweimal 100 % für jeweils 2 min).

Für Sirius Rot- (SR) Färbungen wurden die hydrierten Präparate 90 min unter Schütteln in der zugehörigen Färbelösung inkubiert und zweimal in reinem Ethanol gewaschen.

Die HE- oder SR-gefärbten Schnitte wurden anschließend in Xylol dreimal für jeweils 3 min geklärt und mit schnellhärtendem Eindeckmedium unter einem Deckgläschen eingeschlossen. Mikroskopie und Digitalfotografie der Schnitte erfolgten an einem Fluoreszenzmikroskop, die Nachbearbeitung (Zuschnitt und Einfügen der Maßstabsleiste) in ImageJ (Rasband WS, National Institute of Health).

2.2.17. Statistik

Für statistische Auswertungen und deren grafische Darstellung wurde Prism 10 (GraphPad Software) genutzt.

Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test geprüft. Bei mehreren voneinander unabhängigen Vergleichen (zum Beispiel Gewichtsverläufe bei K14-OVAp) wurde für jeden einzelnen Zeitpunkt ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt mit anschließender p-Wert-Korrektur für multiple Tests nach Holm-Šidák. Ab drei untereinander zu vergleichenden Gruppen erfolgte ein Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Test für Mehrfachvergleiche. Sofern angegeben, wurden Ausreißer vorab mittels ROUT-Methode identifiziert ($Q = 2\%$) und von der Analyse ausgeschlossen.

Alle Daten sind als Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwertes abgebildet. p-Werte mit Zahlenwerten über 0,01 wurden mit zwei, p-Werte zwischen 0,001 und 0,01 mit drei Dezimalstellen und p-Werte unter 0,001 wurden als „ $p \leq 0,001$ “ angegeben. In Abbildungen wurden Signifikanzniveaus wie folgt mit Sternchen dargestellt: *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$.

3. Ergebnisse

3.1. Isolation und Kultur sinusoidaler Leberendothelzellen

LSECs wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation und magnetischer Separation von CD146⁺ Zellen aus Lebern von Ahr^{fl/fl} und Ahr^{ΔCdh5} Mäusen isoliert und in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), supplementiert mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS), 100 U/l Penicillin und 0,1 mg/l Streptomycin (Pen/Strep), auf kollagenisierten 96-Well Zellkulturplatten kultiviert. LSECs stellten sich als Verbände polygonaler und spindelförmiger Zellen dar. Ahr-defiziente LSECs (Ahr^{ΔCdh5}) zeigten gegenüber Kontroll-LSECs (Ahr^{fl/fl}) lichtmikroskopische Veränderungen der Wachstumseigenschaften, Zell- und Kulturmorphologie: Ahr^{ΔCdh5} LSEC-Kulturen wiesen eine höhere Größenvarianz auf, waren häufiger irregulär geformt und häufiger granuliert als Ahr^{fl/fl} LSECs (Abbildung 4).

Um vergleichbare Konfluenzen zu erreichen, mussten Ahr^{ΔCdh5} LSECs in höherer Dichte ausgesät werden als Ahr^{fl/fl} LSECs. Eine 1,25-fach höhere Saatkichte erwies sich als geeignet. Um circa 50 bis 70 % Konfluenz auf 96-well Platten zu erreichen, wurden regelmäßig entsprechend $1 \cdot 10^5$ Ahr^{fl/fl} oder $1,25 \cdot 10^5$ Ahr^{ΔCdh5} LSECs je Well gesät.

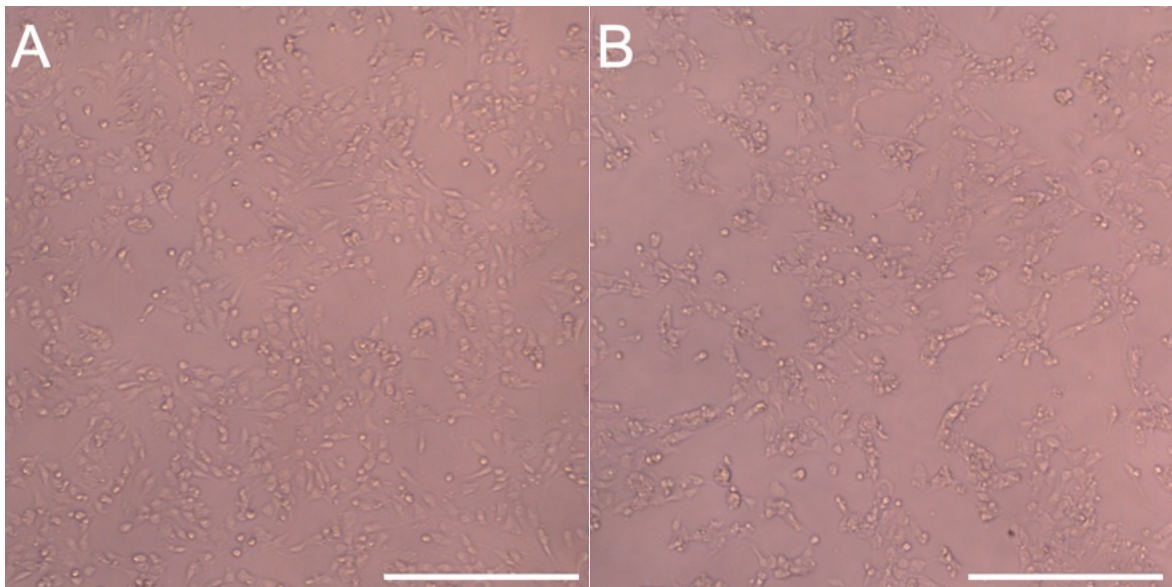


Abbildung 4: LSECs ohne und mit Ahr-Knockout in Zellkultur. LSECs wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation und magnetischer Zellseparation CD146 aufgereinigt, über Nacht kultiviert und vor weiterer Verwendung lichtmikroskopisch begutachtet. **(A)** LSECs aus Ahr^{fl/fl} Mäusen, Saatkichte 10^5 Zellen/Well (96-Well). **(B)** LSECs aus Ahr^{ΔCdh5} Mäusen, Saatkichte $1,25 \cdot 10^5$ Zellen/Well (96-Well). Jeweils repräsentative Übersicht. Maßstabsleisten 200 μ m.

3.2. Ahr-Abhängigkeit der Endotoxintoleranz von LSECs

Der Ahr ist ein wesentlicher Mediator der sogenannten Endotoxintoleranz (Toleranz gegenüber der Exposition von normalerweise entzündungsauslösenden Dosen LPS) (Bessede et al. 2014). Der biologische Sinn der LPS-Toleranz besteht darin, überschießende und für den Organismus schädliche Immunreaktionen bei erhöhter LPS-Exposition zu unterdrücken. Übereinstimmend werden für verschiedene Zellarten limitierte Reaktionen auf wiederholte LPS-Expositionen beschrieben, darunter LSECs. LSECs sind hauptverantwortlich für die LPS-Clearance. Nach wiederholter LPS-Exposition sezernieren sie weniger proinflammatorische Zytokine und zeigen geringere Leukozytenadhäsion als nach Erstexposition (Uhrig et al. 2005). Vorarbeiten zeigten, dass Ahr-defiziente LSECs in vitro mit einer stärkeren IL-6-Antwort auf LPS reagierten als Zellen ohne Ahr-Knockout. In LSECs aus C57BL/6 Mäusen milderten die Ahr-Agonisten ITE und FICZ, nicht aber TCDD, die IL-6-Antwort ab, erstaunlicherweise galt dies aber ebenfalls für den Ahr-Antagonisten CH223191 (Lommetz 2022). Die beschriebenen LPS-Stimulationsversuche wurden hier in mehreren Varianten wiederholt, unter anderem um Ahr-unabhängige Effekte der Liganden zu ermitteln.

Ahr^{fl/fl} und Ahr^{ΔCdh5} LSECs wurden jeweils über Nacht kultiviert und anschließend für 20 h mit 1 µg/ml LPS und den jeweiligen Ahr-Agonisten inkubiert. Nachfolgend wurde die IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Ahr-defiziente LSECs zeigten in mehreren unabhängigen Versuchen durchweg stärkere IL-6-Antworten als Kontrollzellen mit funktionellem Ahr.

Zuerst wurde in LSECs beider Genotypen der Effekt der Ahr-Agonisten ITE, FICZ, L-Kyn, TCDD oder entsprechender Vehikelkontrollen geprüft. Bei allen Substanzen zeigten Ahr^{ΔCdh5} LSECs eine stärkere IL-6-Antwort auf LPS (jeweils $p = 0,05$). Bei Ahr^{fl/fl} LSECs zeigte keiner der Ahr-Agonisten gegenüber der jeweiligen Vehikelkontrolle einen Effekt (DMSO vs. ITE: $p = 0,66$; DMSO vs. FICZ: $p = 0,33$; DMSO vs. L-Kyn: $p > 0,99$; Toluol vs. TCDD: $p > 0,99$). Erstaunlicherweise hatte ITE jedoch in Ahr^{ΔCdh5} LSECs eine tendenziell abgeschwächte ($p = 0,06$) und TCDD eine signifikant verstärkte ($p = 0,004$) IL-6-Antwort zur Folge. L-Kyn und FICZ zeigten auch bei Ahr^{ΔCdh5} LSECs keinen Effekt gegenüber Vehikelkontrollen (jeweils $p > 0,99$). Bei beiden Genotypen war die IL-6-Konzentration im Überstand nach Behandlung mit dem TCDD-Vehikel Toluol signifikant geringer als nach Behandlung mit DMSO (Ahr^{fl/fl}: $p = 0,004$; Ahr^{ΔCdh5}: $p = 0,03$). $p < 0,001$) (Abbildung 5).

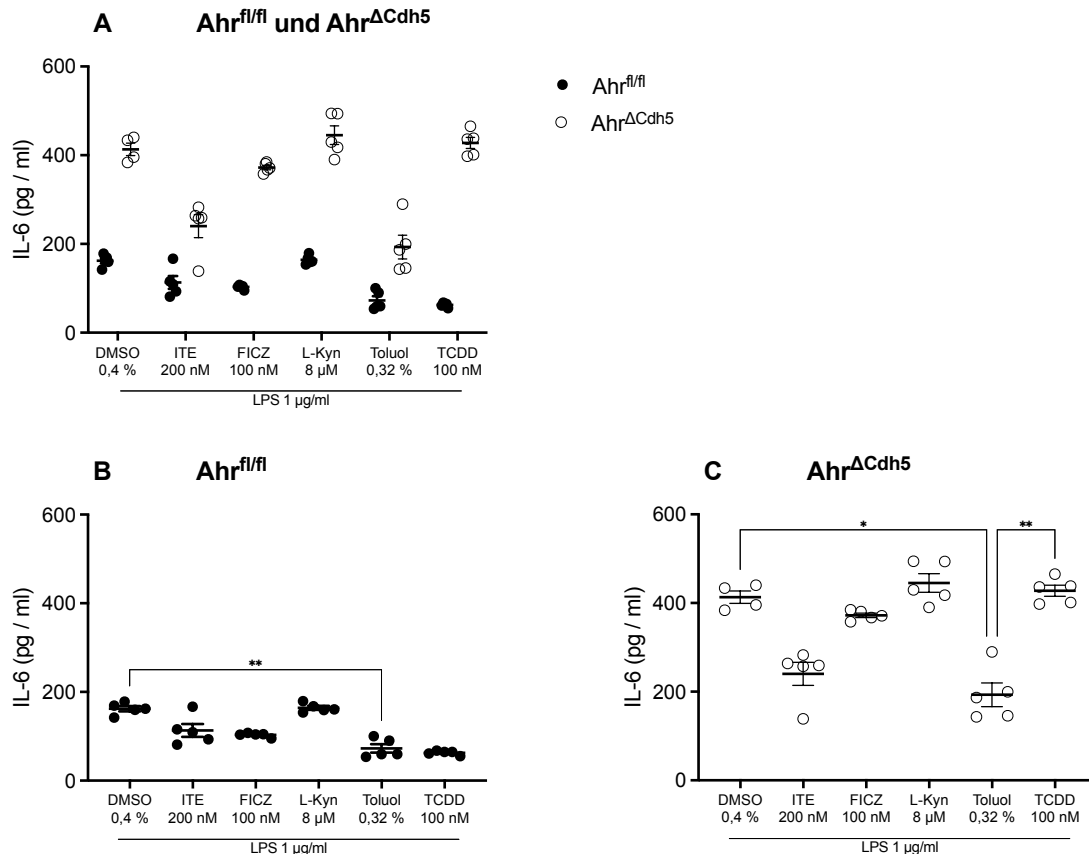


Abbildung 5: LPS-induzierte IL-6-Antworten in LSECs ohne und mit Ahr-Knockout bei simultaner Behandlung mit Ahr-Agonisten. LSECs wurden über Nacht kultiviert, dann für 20 h mit LPS und den Ahr-Agonisten ITE, FICZ, L-Kyn, TCDD oder der jeweiligen Vehikelkontrolle (Toluol für TCDD, DMSO für die weiteren) inkubiert. Anschließend wurde die IL-6-Konzentration im Überstand mittels ELISA erfasst (Ahr^{ΔCdh5} mit DMSO: n = 4, alle weiteren: n = 5). **(A)** Vergleiche zwischen Ahr^{fl/fl} und Ahr^{ΔCdh5} LSECs. **(B)** Effekte der Ahr-Agonisten in Ahr^{fl/fl} LSECs **(C)** Effekte der Ahr-Agonisten in Ahr^{ΔCdh5} LSECs. *: p ≤ 0,05, **: p ≤ 0,01.

In einem unabhängigen Versuch wurde die Wirkung des Ahr-Antagonisten CH223191 untersucht. Ahr^{fl/fl} LSECs wurden mit LPS und Vehikel (DMSO), 5 μM, 10 μM oder 50 μM CH223191 behandelt, Ahr^{ΔCdh5} LSECs entweder mit dem Vehikel oder mit 50 μM des Antagonisten. Übereinstimmend mit den Vorergebnissen zeigte sich erneut, dass CH223191 die IL-6-Antwort in Ahr^{fl/fl} abschwächte (0 μM vs. 50 μM: p < 0,001), tendenziell war die Wirkung dosisabhängig (0 μM vs. 5 μM: p = 0,47; 0 μM vs. 10 μM: p = 0,15; 5 μM vs. 10 μM: p > 0,99; 5 μM vs. 50 μM: p = 0,15; 10 μM vs. 50 μM: p = 0,47). Ahr^{ΔCdh5} LSECs reagierten auf die Behandlung allerdings wider Erwarten ebenfalls mit einer abgeschwächten IL-6-Antwort (p = 0,03) (Abbildung 6).

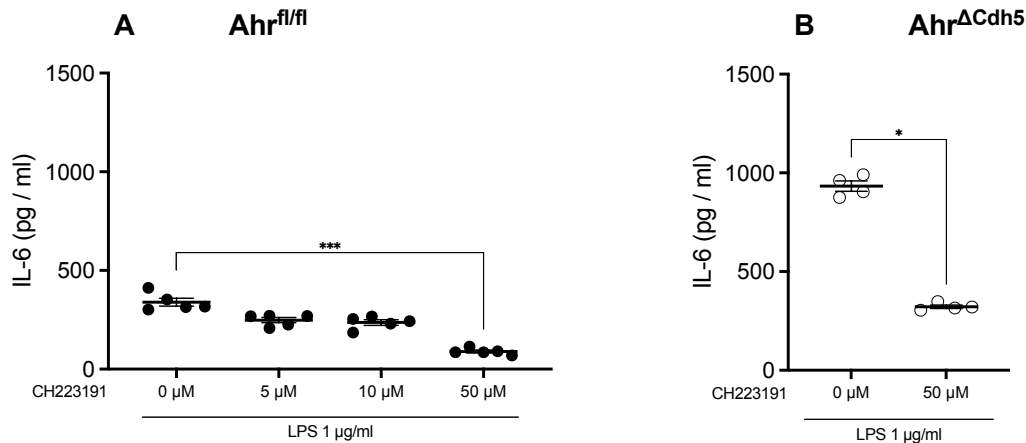


Abbildung 6: LPS-induzierte IL-6-Antworten in LSECs ohne und mit Ahr-Knockout bei simultaner Behandlung mit dem Ahr-Antagonisten CH223191. LSECs wurden über Nacht kultiviert, dann für 20 h mit LPS und dem Ahr-Antagonisten CD223191 in den angegebenen Konzentrationen oder mit der Vehikelkontrolle (DMSO) inkubiert. Anschließend wurde die IL-6-Konzentration im Überstand mittels ELISA erfasst ($Ahr^{fl/fl}$ jeweils: $n = 5$, $Ahr^{\Delta Cdh5}$ jeweils: $n = 4$). (A) $Ahr^{fl/fl}$ LSECs. (B) $Ahr^{\Delta Cdh5}$ LSECs. *: $p < 0,05$, ***: $p \leq 0,001$.

Die in dieser Arbeit zur Etablierung der Mauslinie $Ahr^{\Delta Cdh5}$ verwendete $Ahr^{fl/fl}$ Linie trägt das Allel Ahr^d , das DBA/2 Mäusen entstammt und für einen niedriger affinen Ahr kodiert als das Ahr^{b-1} -Allel in konventionellen C57BL/6 Mäusen (Poland et al. 1994). Deshalb wurden im folgenden Experiment LSECs aus Mäusen mit Ahr^{b-1} Allel (B6.SJL Linie) hinsichtlich ihrer Reaktion auf LPS in Kombination mit Ahr-Agonisten und -Antagonisten untersucht. Die LSECs wurden über Nacht kultiviert und mit LPS oder PBS als Vehikelkontrolle und dem Ahr-Antagonisten CH223191, dem Agonisten ITE oder DMSO als Vehikelkontrolle behandelt. Die Konzentration des LPS-induzierten IL-6 war bei CH223191-behandelten LSECs erneut reduziert ($p = 0,03$), ITE hatte keinen signifikanten Effekt ($p > 0,99$) (Abbildung 7).

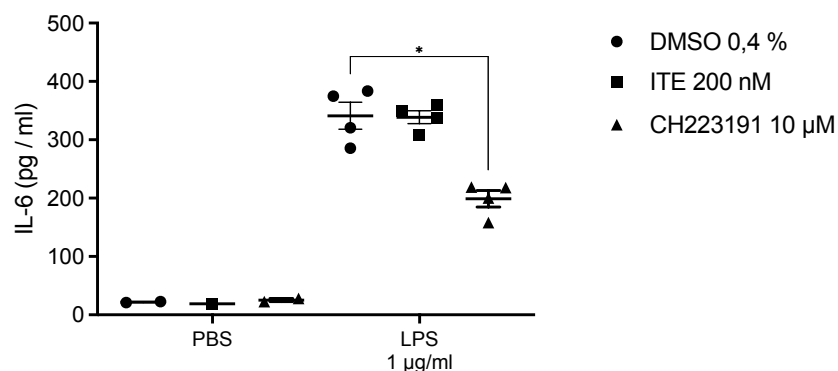


Abbildung 7: Modulation LPS-induzierter IL-6-Antworten durch CH223191 und ITE in LSECs aus B6.SJL Mäusen. B6.SJL Mäuse tragen das Allel Ahr^{b-1} , welches für eine höheraffine Variante des Ahr kodiert als Ahr^d aus $Ahr^{tm3.1Bra/J}$ Mäusen, dem genetischen Hintergrund für konditionelle Ahr-Knockouts in dieser Arbeit. LSECs aus B6.SJL Mäusen wurden über Nacht kultiviert, dann für 20 h mit LPS oder Vehikelkontrolle (PBS) und dem Ahr-Antagonisten CD223191, dem Agonisten ITE oder Vehikelkontrolle (DMSO) inkubiert. Anschließend wurde die IL-6-Konzentration im Überstand mittels ELISA erfasst (PBS jeweils: $n = 2$, LPS jeweils: $n = 4$). *: $p < 0,05$.

3.3. Ahr-Abhängigkeit der Treg-Induktion durch LSECs in vitro

LSECs sind von den APCs der Leber in vitro die potentesten Induktoren antigenspezifischer, funktionell Autoimmunität-supprimierender Tregs (Carambia et al. 2014). In BMDCs ist die Fähigkeit, Tregs zu induzieren, durch Ahr-Aktivierung begünstigt und umgekehrt durch Ahr-Defizienz beeinträchtigt (Jurado-Manzano et al. 2017; Quintana et al. 2010; Nguyen et al. 2010; Mezrich et al. 2010; Hauben et al. 2008).

In Konversionsassays sollte mit Ahr-defizienten LSECs und mit Ahr-Agonisten geprüft werden, ob die Fähigkeit der LSECs, in vitro Tregs zu induzieren, ebenfalls Ahr-abhängig ist. LSECs aus Ahr^{fl/fl} und Ahr^{ΔCdh5} Mäusen wurden über Nacht vorkultiviert. Aus Milzen von 2D2 Mäusen mit transgenem MOG-Peptid-spezifischem T-Zell-Rezeptor wurden CD4⁺CD25⁻ T-Zellen (non-Treg) isoliert. Für den Konversionsassay wurden die vorkultivierten LSECs und als Vergleichspopulationen frisch isolierte Leber-DCs (LDCs) und Milz-DCs (MDCs) aus Ahr^{fl/fl} und Ahr^{ΔItgax} Tieren (jeweils 5 * 10⁴ je Well) mit 2D2 CD4⁺CD25⁻ T-Zellen (5 * 10⁵ je Well) in serumfreiem Panzerin-Medium mit Pen/Strep, supplementiert mit 2 ng/ml TGF-β und 1 μg/ml MOG-Peptid, für 4 d kokultiviert und antigenspezifisch aktiviert. Die T-Zellen wurden anschließend geerntet und durchflusszytometrisch analysiert.

Ahr^{ΔCdh5} LSECs induzierten signifikant weniger CD25⁺Foxp3⁺ Tregs als Ahr^{fl/fl} LSECs (p = 0,02). In LDCs war die Treg-Konversion durch Ahr-Defizienz begünstigt (p = 0,008), in MDCs beeinträchtigte der Knockout die Konversion (p = 0,04) (Abbildung 8).

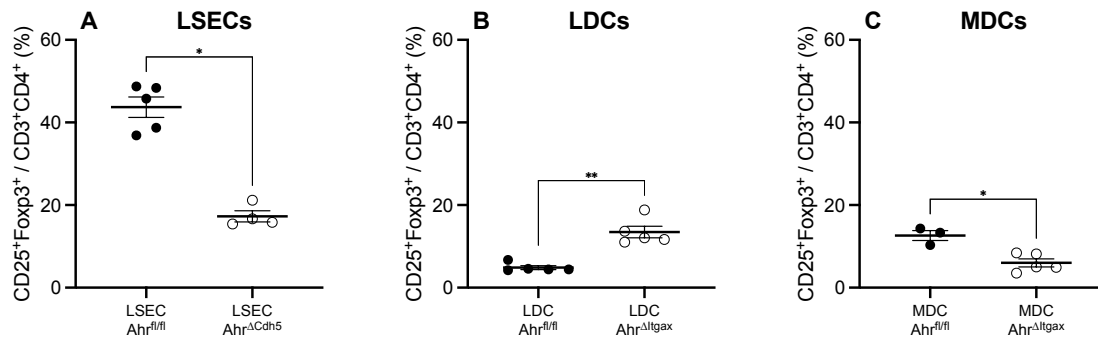


Abbildung 8: Ahr-abhängige Treg-Konversion durch LSECs, Leber-DCs und Milz-DCs in vitro.

LSECs aus Ahr^{fl/fl} oder Ahr^{ΔCdh5} Tieren wurden über Nacht vorkultiviert, Leber-DCs (LDCs) und Milz-DCs (MDCs) aus Ahr^{fl/fl} oder Ahr^{ΔItgax} Mäusen wurden ohne vorangehende Kultur mit CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus 2D2 Mäusen über 4 d in TGF-β-supplementiertem Medium in Gegenwart von MOG-Peptid kultiviert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert (LSEC Ahr^{ΔCdh5}; n = 4, MDC Ahr^{fl/fl} jeweils: n = 3, alle anderen jeweils: n = 5). (A) CD25⁺Foxp3⁺ Treg-Frequenz nach Stimulation durch LSECs, (B) durch LDCs und (C) durch MDCs. *: p ≤ 0,05, **: p ≤ 0,01.

3.4. Rolle des Ahr in Modellen entzündlicher Lebererkrankungen

Aufgrund seiner bekannten Rolle als Regulator von Immunantworten ist der Ahr ein potenzielles immuntherapeutisches Zielmolekül, insbesondere im Kontext autoimmuner und maligner Erkrankungen (Gutiérrez-Vázquez und Quintana 2018). Inwiefern der Ahr an der hepatischen Immunmodulation beteiligt ist und inwieweit ihm ein therapeutischer Stellenwert bei der Behandlung bestimmter entzündlicher Lebererkrankungen zukommen könnte, ist bislang wenig erforscht (Carambia und Schuran 2021). Die bisherigen Untersuchungen deuten darauf hin, dass der Ahr in der Leber eine komplexe Rolle spielt und seine Aktivierung sowohl günstige als auch ungünstige Effekte bei Leberentzündung und -schädigung

haben kann. So wurde gezeigt, dass der als nicht-toxisch geltende immunmodulatorische Ahr-Ligand ITE die Hepatotoxizität von Paracetamol erheblich aggraviert (Schuran et al. 2021).

Um die Rolle des Ahr in Modellen entzündlicher Lebererkrankungen zu klären, wurden in dieser Arbeit Mäuse mit konditionellen Ahr-Knockouts in Leber-APCs verwendet oder der Ahr durch die systemische Gabe des Liganden ITE in vivo aktiviert.

3.4.1. ITE bei DDC-induziertem cholestatischem Leberschaden

Fütterung von Mäusen mit DDC führt zu einer akuten cholestatischen Lebererkrankung mit sklerosierender Cholangitis. Ursächlich ist eine gestörte Häm-Synthese mit Porphyrin-Akkumulation und Abscheiden biliärer Porphyrin-Konkremente mit obstruktiver Cholestase (Maitra et al. 2019). Spätestens nach dem ersten Behandlungstag sind progrediente Cholangitis und Pericholangitis mit neutrophil-granulozytären periduktalen Infiltraten und Leberschaden nachweisbar, nach wenigen Tagen zeigen sich intraduktale Porphyrin-Konkremente und periduktale Fibrose (Jemail et al. 2018; Fickert et al. 2007).

Dieser Arbeit vorangegangene unveröffentlichte Versuche zeigten, dass DDC-gefütterte C57BL/6J Mäuse durch regelmäßige ITE-Gaben vor einer Leberschädigung geschützt waren, während Vehikel-behandelte Tiere typisch erkrankten. In den Gallengängen ITE-behandelter Tiere waren histologisch jedoch auch keine Porphyrin-Konkremente nachzuweisen. Dies legte den Verdacht nahe, dass hier eher eine pharmakologische Interaktion zwischen DDC und ITE führend war als eine protektive immunologische Wirkung des ITE. Der Versuch wurde daher im Rahmen dieser Arbeit um Mäuse mit konditionellem Ahr-Knockout in Hepatozyten (Ahr^{ΔAlb}) erweitert, um eine mögliche unerwünschte Wirkung des ITE auf den Hepatozytenstoffwechsel im DDC-Modell auszuschließen.

Weibliche 8 bis 14 Wochen alte Ahr^{fl/fl} Mäuse und Ahr^{ΔAlb} Mäuse erhielten 0,1 % DDC in Trockenfutter ad libitum. Ab 24 h vor Beginn der DDC-Fütterung wurden den Tieren entweder täglich 200 µg ITE oder als Vehikelkontrolle 50 µl Maisöl i.p. injiziert. Nach 72 h DDC-Fütterung wurden die Tiere getötet, die Serum-Transaminasenaktivitäten bestimmt, HE-gefärbte FFPE-Schnitte der Leber angefertigt und durchflusszytometrische Analysen der Leber- und Milz-NPCs hinsichtlich der Zusammensetzung der T-Zell Subpopulationen und der inflammatorischen Monozyten durchgeführt.

Die AST- und ALT-Serumaktivitäten aller DDC-gefütterten Tiere waren, dem Befund einer Leberschädigung entsprechend, erhöht. Tendenziell zeigten ITE-behandelte Ahr^{fl/fl} Mäuse höhere Serum-Transaminasenaktivitäten als Vehikel-behandelte Tiere gleichen Genotyps. Die Aktivitäten der Transaminasen unterschieden sich unabhängig von einer Behandlung mit ITE weder innerhalb eines Genotyps (AST bei Ahr^{fl/fl}: p = 0,51; AST bei Ahr^{ΔAlb}: p > 0,99; ALT bei Ahr^{fl/fl}: p = 0,84; ALT bei Ahr^{ΔAlb}: p > 0,99) noch zwischen den beiden Genotypen signifikant (AST bei Vehikel: p = 0,47; ALT bei Vehikel, AST und ALT bei ITE jeweils: p > 0,99) (Abbildung 9).

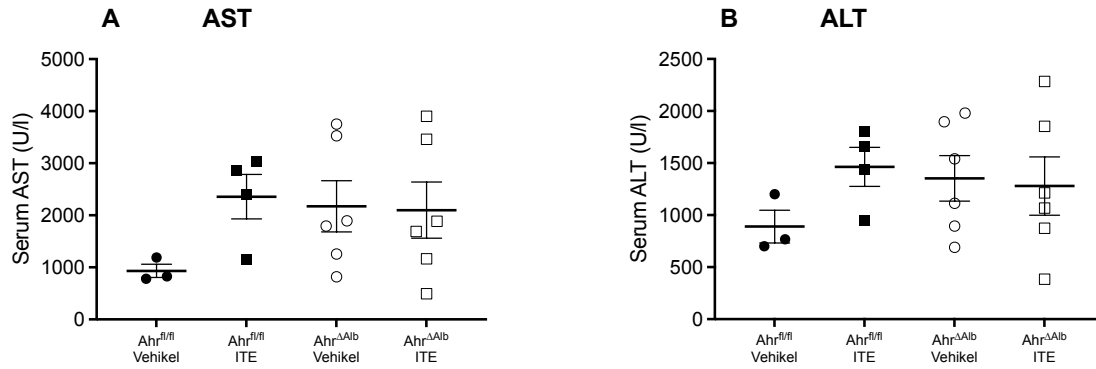


Abbildung 9: DDC-induzierte Leberschädigung bei konditionellem Ahr-Knockout in Hepatozyten und Behandlung mit dem Ahr-Agonisten ITE. Weibliche Mäuse ohne (Ahr^{fl/fl}) und mit Hepatozyten-spezifischem Ahr-Knockout (Ahr^{ΔAlb}) wurden für 72 h mit DDC gefüttert und parallel mit dem Ahr-Agonisten ITE oder Vehikel behandelt (Vehikel-behandelte Ahr^{fl/fl}: n = 3, ITE-behandelte Ahr^{fl/fl}: n = 4, Ahr^{ΔAlb} jeweils: n = 6). **(A)** AST-Serumaktivität. **(B)** ALT-Serumaktivität.

Auf die Zelldichte der NPCs im Lebergewebe und den Anteil CD3⁺ T-Zellen an CD45⁺ Leber-NPCs hatten weder der Genotyp (Zelldichte bei Vehikel und bei ITE und CD3⁺/CD45⁺ bei Vehikel jeweils: p > 0,99; CD3⁺/CD45⁺ bei ITE: p = 0,79) noch eine ITE-Behandlung signifikanten Einfluss (Zelldichte bei Ahr^{fl/fl}: p > 0,99; Zelldichte bei Ahr^{ΔAlb}: p = 0,38; CD3⁺/CD45⁺ bei Ahr^{fl/fl}: p = 0,22; CD3⁺/CD45⁺ bei Ahr^{ΔAlb}: p = 0,57) (Abbildung 10).

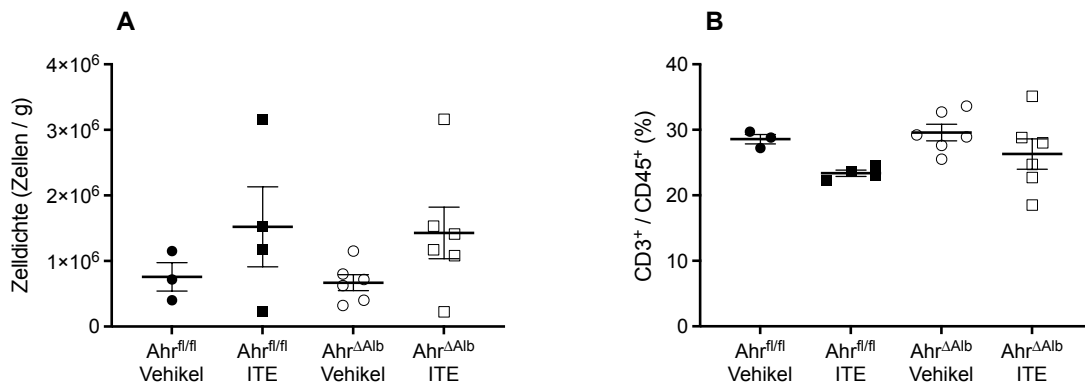


Abbildung 10: Entzündliches Infiltrat in Lebern von Mäusen mit DDC-induzierter Leberschädigung bei konditionellem Ahr-Knockout in Hepatozyten und Behandlung mit dem Ahr-Agonisten ITE. Weibliche Mäuse ohne (Ahr^{fl/fl}) und mit Hepatozyten-spezifischem Ahr-Knockout (Ahr^{ΔAlb}) wurden für 72 h mit DDC gefüttert und parallel mit dem Ahr-Agonisten ITE oder Vehikel behandelt (Vehikel-behandelte Ahr^{fl/fl}: n = 3, ITE-behandelte Ahr^{fl/fl}: n = 4, Ahr^{ΔAlb} jeweils: n = 6). **(A)** Dichte nichtparenchymaler Zellen in Lebergewebe (bezogen auf Feuchtgewicht). **(B)** Anteil CD3⁺ T-Zellen am CD45⁺ Infiltrat.

Histologisch wiesen ITE- und Vehikel-behandelte $Ahr^{fl/fl}$ und $Ahr^{\Delta Alb}$ Tiere in HE-gefärbten Leberschnitten gleichermaßen periduktale lymphozytäre Infiltrate und Porphyrin-Konkremente im Sinne einer cholestatischen Cholangitis auf (Abbildung 11). Auf ein systematisches Scoring der histologischen Befunde wurde verzichtet.

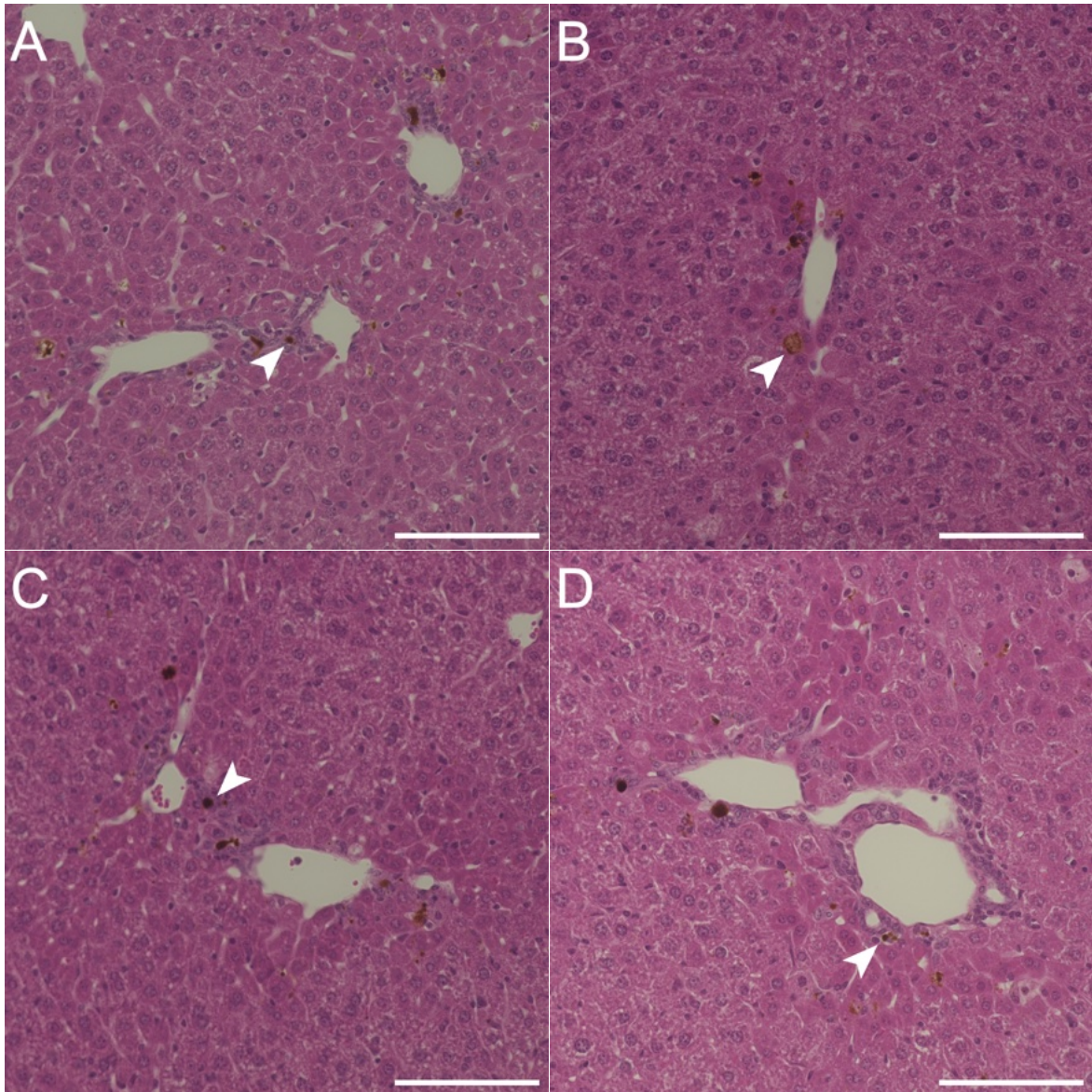


Abbildung 11: Leberhistologie von Mäusen mit DDC-induzierter obstruktiver Cholangiopathie bei konditionellem Ahr-Knockout in Leberzellen und Behandlung mit dem Ahr-Agonisten ITE. Dargestellt sind repräsentative histologische Befunde (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) mit Aufnahmen von Portalfeldern weiblicher Mäuse ohne ($Ahr^{fl/fl}$) und mit konditionellem Ahr-Knockout in Hepatozyten ($Ahr^{\Delta Alb}$) nach Fütterung mit DDC für 72 h und paralleler Behandlung mit dem Ahr-Agonisten ITE oder Vehikel (Maisöl). Modelltypische Porphyrin-Konkremente sind exemplarisch mit Pfeilen markiert. (A) $Ahr^{fl/fl}$, Vehikel. (B) $Ahr^{fl/fl}$, ITE. (C) $Ahr^{\Delta Alb}$, Vehikel. (D) $Ahr^{\Delta Alb}$, ITE. Maßstabsleisten 100 μ m.

Die Frequenzen der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in Leber- und Milz-NPCs unterschieden sich weder zwischen beiden Genotypen (jeweils $p > 0,99$) noch durch eine ITE-Behandlung ($CD4^+$ in Milzen bei $Ahr^{fl/fl}$: $p = 0,67$; $CD4^+$ in Milzen bei $Ahr^{\Delta Alb}$: $p = 0,70$; weitere jeweils $p > 0,99$) signifikant. Gleiches galt für die relative Häufigkeit inflammatorischer Monozyten, charakterisiert als $CD11b^+Ly6C^{hi}Ly6G^-CD11c^-$ (Lebern bei $Ahr^{fl/fl}$: $p = 0,55$; Lebern bei ITE: $p = 0,53$; Milzen bei $Ahr^{fl/fl}$: $p = 0,07$; Milzen bei ITE: $p = 0,34$; weitere jeweils $p > 0,99$). Das Leber-Infiltrat bei ITE-behandelten $Ahr^{\Delta Alb}$ Tieren war signifikant reicher an

Neutrophilen ($CD11b^{+}Ly6G^{+}$) als bei Vehikel-Behandlung ($p = 0,01$), darüber hinaus zeigte sich in Lebern ($Ahr^{fl/fl}$: $p = 0,29$; Vehikel und ITE jeweils: $p > 0,99$) und Milzen ($Ahr^{fl/fl}$: $p = 0,52$; $Ahr^{\Delta Alb}$ und Vehikel jeweils: $p > 0,99$; ITE: $p = 0,43$) dahingehend kein signifikanter Unterschied. Die Frequenz der $CD25^{+}Foxp3^{+}$ Tregs in Milzen ITE-behandelter $Ahr^{fl/fl}$ Tiere war signifikant geringer als bei Vehikel-behandelten Tieren ($p = 0,05$), ansonsten zeigte sich in Lebern und Milzen bei den Treg-Frequenzen kein signifikanter Unterschied (Lebern bei $Ahr^{fl/fl}$: $p = 0,22$; Lebern bei $Ahr^{\Delta Alb}$: $p = 0,39$; Lebern bei Vehikel und ITE, Milzen bei $Ahr^{\Delta Alb}$ und bei Vehikel jeweils: $p > 0,99$; Milzen bei ITE: $p = 0,49$) (Abbildung 12 und Abbildung 13).

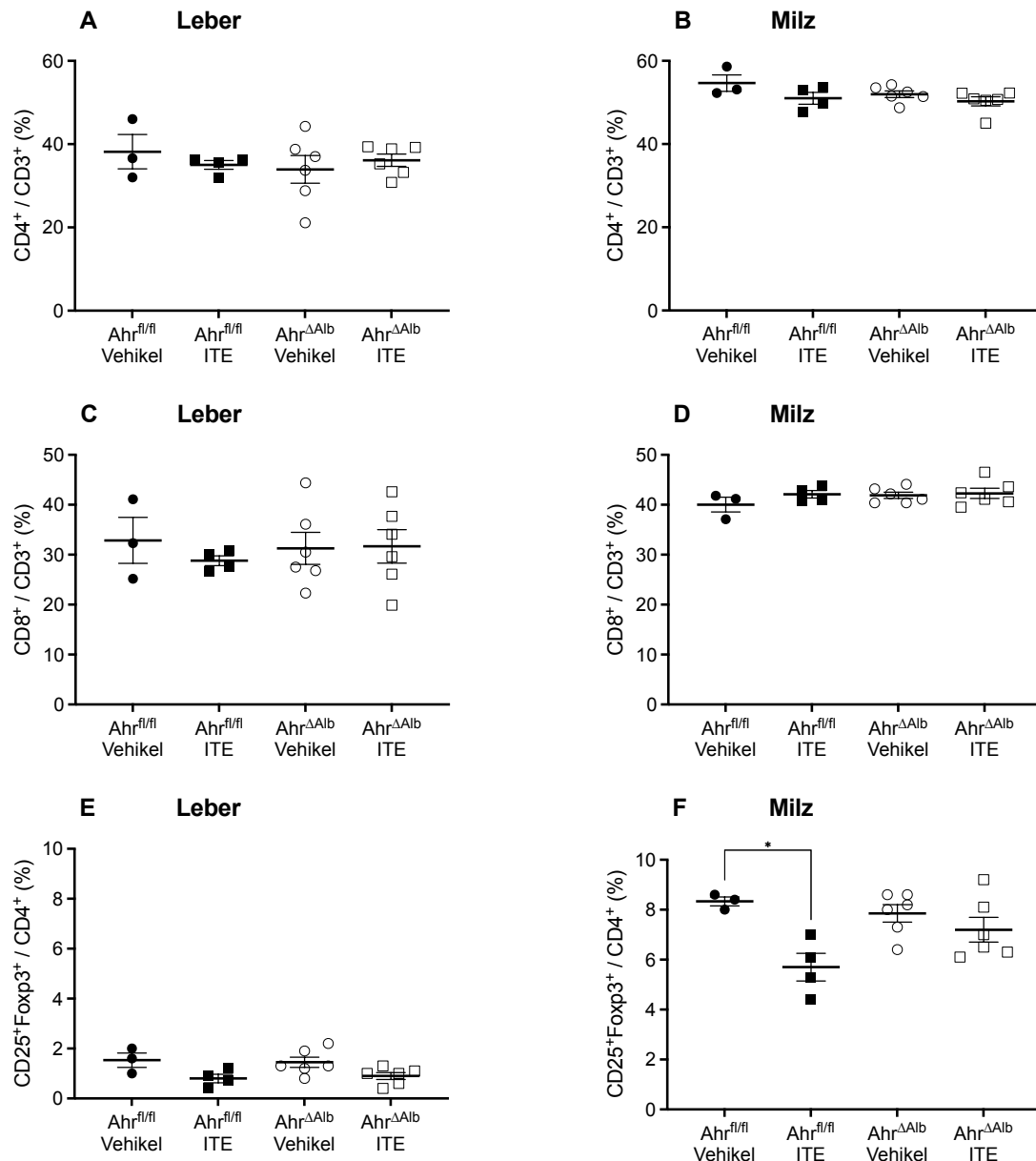


Abbildung 12: Durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Populationen in Leber und Milz von Mäusen mit DDC-induzierter Leberschädigung bei konditionellem Ahr-Knockout in Hepatozyten und Behandlung mit dem Ahr-Agonisten ITE. Weibliche Mäuse ohne ($Ahr^{fl/fl}$) und mit Hepatozyten-spezifischem Ahr-Knockout ($Ahr^{\Delta Alb}$) wurden für 72 h mit DDC gefüttert und parallel mit dem Ahr-Agonisten ITE oder Vehikel behandelt. Zellsuspensionen von Lebern und Milzen wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert (Vehikel-behandelte $Ahr^{fl/fl}$: $n = 3$, ITE-behandelte $Ahr^{fl/fl}$: $n = 4$, $Ahr^{\Delta Alb}$ jeweils: $n = 6$). (A) Anteile $CD4^{+}$ an $CD45^{+}CD3^{+}$ Zellen in Leber und (B) Milz. (C) Anteile $CD8^{+}$ an $CD45^{+}CD3^{+}$ Zellen in Leber und (D) Milz. (E) Anteile $CD25^{+}Foxp3^{+}$ an $CD3^{+}CD4^{+}$ Zellen in Leber und (F) Milz. *: $p \leq 0,05$.

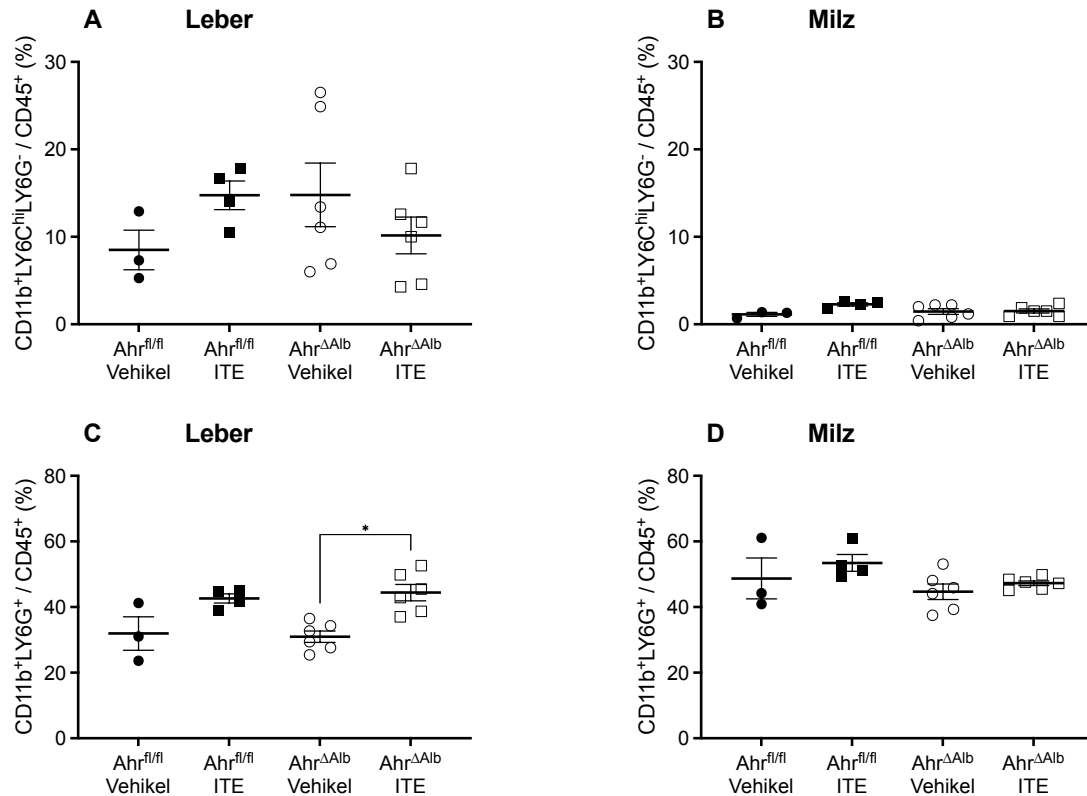


Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analyse der Neutrophilen und Monozyten in Leber und Milz von Mäusen mit DDC-induzierter Leberschädigung bei konditionellem Ahr-Knockout in Hepatozyten und Behandlung mit dem Ahr-Agonisten ITE. Weibliche Mäuse ohne (Ahr^{fl/fl}) und mit Hepatozytenspezifischem Ahr-Knockout (Ahr^{ΔAlb}) wurden für 72 h mit DDC gefüttert und parallel mit dem Ahr-Agonisten ITE oder Vehikel behandelt. Zellsuspensionen von Lebern und Milzen wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert (Vehikel-behandelte Ahr^{fl/fl}: n = 3, ITE-behandelte Ahr^{fl/fl}: n = 4, Ahr^{ΔAlb} jeweils: n = 6). (A) Anteile der Monozyten (CD11b⁺LY6C^{hi}LY6G⁻) an CD45⁺ Zellen in Leber und (B) Milz. (C) Anteile der Neutrophilen (CD11b⁺LY6G⁺) an CD45⁺ Zellen in Leber und (D) Milz. *: p ≤ 0,05.

Der zuvor in C57BL/6J Mäusen beobachtete Schutz vor DDC-induzierter Lebererkrankung durch ITE-Behandlung konnte in Ahr^{fl/fl} und in Ahr^{ΔAlb} Mäusen nicht nachgewiesen werden, allerdings mit folgendem Vorbehalt: Die in dieser Arbeit für konditionelle Ahr-Knockouts verwendeten Mäuse mit Ahr^{tm3.1Bra/J} Hintergrund tragen das Allel Ahr^d, welches für einen Ahr mit niedrigerer Ligandenaffinität kodiert als das Genprodukt des Allels Ahr^{b-1} in C57BL/6J Mäusen (Poland et al. 1994).

Analog zur ursprünglichen Versuchskonfiguration wurde daher weiblichen 9 Wochen alten C57BL/6J Mäusen 0,1 % DDC in Trockenfutter ad libitum gefüttert. Ab 24 h vor Beginn der DDC-Fütterung wurden den Tieren entweder täglich 200 µg ITE oder als Vehikelkontrolle 50 µl 1:25 verdünntes DMSO in PBS i.p. injiziert. Nach 72 h DDC-Fütterung wurden die Tiere getötet, die Serum-Transaminasenaktivitäten bestimmt und durchflusszytometrische Analysen der Leber- und Milz-NPCs hinsichtlich der Zusammensetzung der T-Zell-Subpopulationen und der inflammatorischen Monozyten durchgeführt.

Der histologische Leberbefund zeigte erneut sowohl bei ITE- als auch bei Vehikel-behandelten Tieren gleichermaßen ausgeprägte periduktale lymphozytäre Infiltrate und intraduktale Konkrementen (nicht dargestellt, kein systematisches Scoring).

Die Serumaktivitäten der Transaminasen in Tieren beider Gruppen waren einer Leberschädigung entsprechend erhöht. ITE hatte keinen signifikanten Effekt auf die Transaminasenaktivitäten (AST: $p = 0,34$; ALT: $p = 0,49$), tendenziell waren sie in ITE-behandelten Tiere stärker erhöht (Abbildung 14).

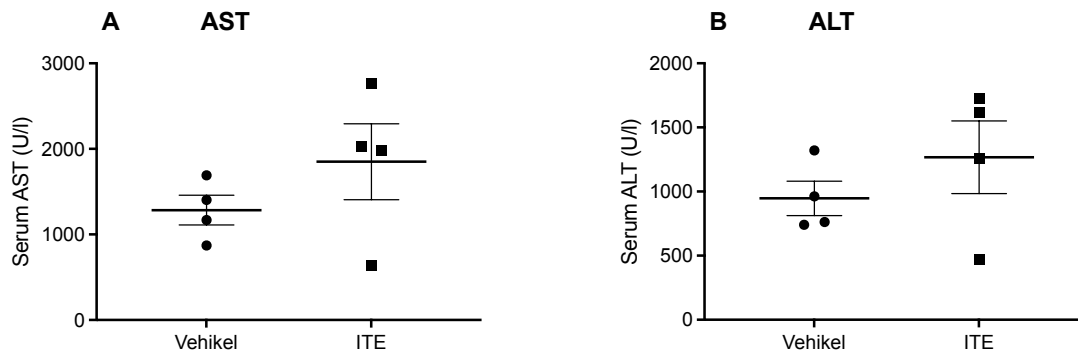


Abbildung 14: Serum-Transaminasenaktivitäten bei DDC-induzierter Leberschädigung und Behandlung mit dem Ahr-Agonisten ITE in C57BL/6J Mäusen. Weibliche C57BL/6J Mäuse wurden für 72 h mit DDC gefüttert und parallel mit dem Ahr-Agonisten ITE oder Vehikel behandelt (jeweils $n = 4$). **(A)** AST-Serumaktivität. **(B)** ALT-Serumaktivität.

ITE beeinflusste auch in DDC-behandelten C57BL/6J Mäusen weder die Zelldichte der NPCs im Lebergewebe ($p = 0,89$) noch den Anteil $CD3^+$ T-Zellen im $CD45^+$ Leberinfiltrat ($p = 0,40$) (Abbildung 15).

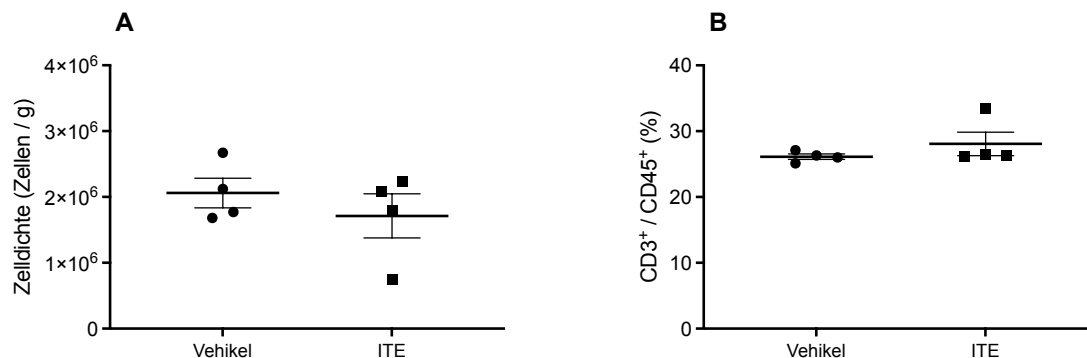


Abbildung 15: Entzündliches Infiltrat in Lebern von C57BL/6J Mäusen mit DDC-induzierter Leberschädigung und Behandlung mit dem Ahr-Agonisten ITE. Weibliche C57BL/6J Mäuse wurden für 72 h mit DDC gefüttert und parallel mit dem Ahr-Agonisten ITE oder Vehikel behandelt (jeweils $n = 4$). **(A)** Dichte nichtparenchymaler Zellen in Lebergewebe (bezogen auf Feuchtgewicht). **(B)** Durchflusszytometrisch gemessener Anteil $CD3^+$ T-Zellen am $CD45^+$ Leberinfiltrat.

Die Frequenzen durchflusszytometrisch differenzierter T-Zellen ($CD4^+$, $CD8^+$ und $CD25^+Foxp3^+$), inflammatorischer Monozyten ($CD11b^+Ly6G^-Ly6C^{hi}$) und neutrophiler Granulozyten ($CD11b^+Ly6G^+$) in Lebern und Milzen unterschieden sich nicht signifikant (Leber $CD4^+$: $p > 0,99$; Milz $CD4^+$: $p = 0,89$; $CD8^+$ Leber und Milz jeweils: $p > 0,99$; $CD25^+Foxp3^+$ Leber: $p = 0,89$; $CD25^+Foxp3^+$ Milz: $p = 0,34$; $CD11b^+Ly6G^-Ly6C^{hi}$ Leber: $p = 0,34$; $CD11b^+Ly6G^-Ly6C^{hi}$ Milz: $p = 0,83$; $CD11b^+Ly6G^+$ Leber und Milz jeweils: $p = 0,89$) (Abbildung 16 und Abbildung 17).

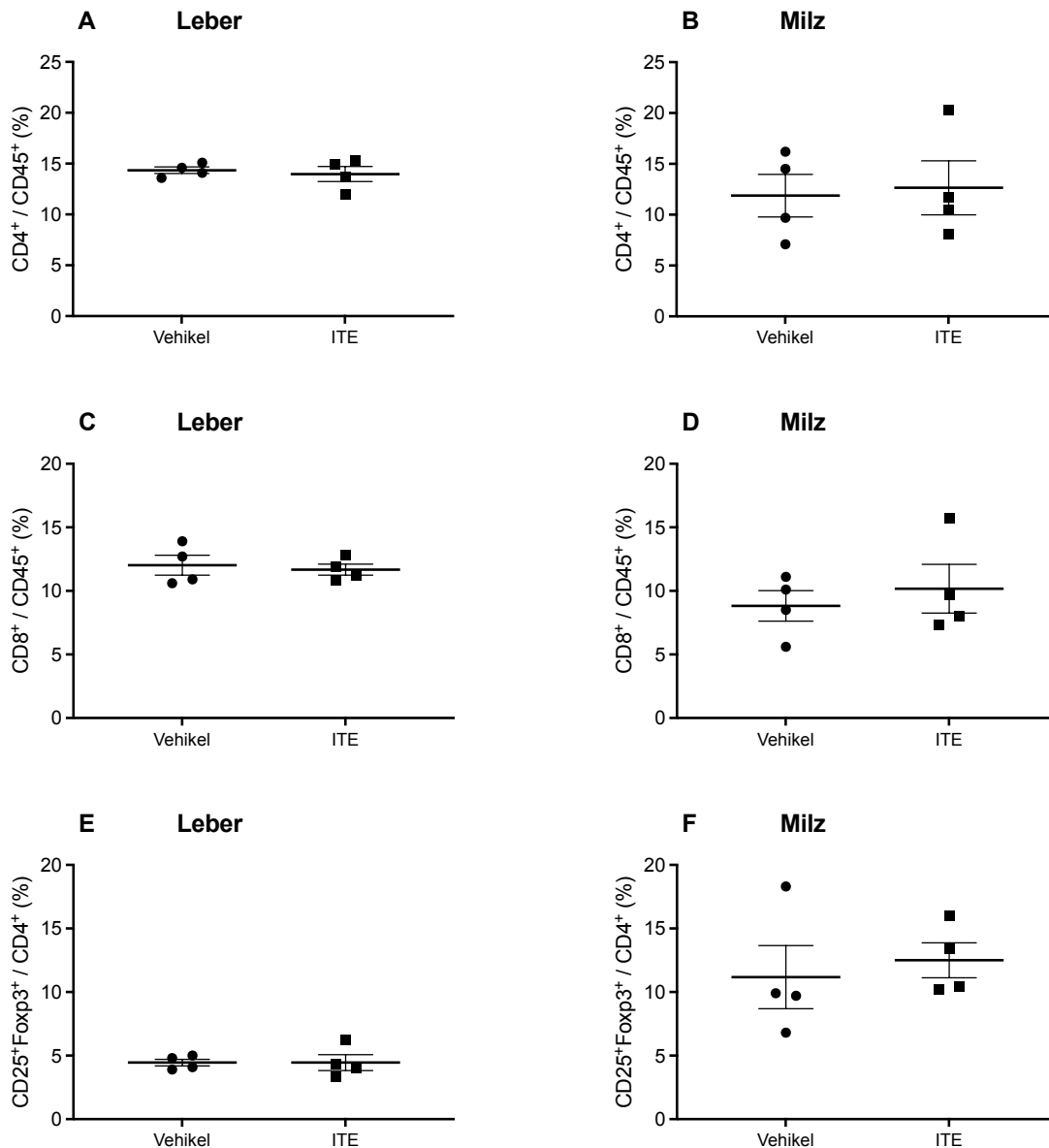


Abbildung 16: Durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Populationen in Leber und Milz ITE-behandelter C57BL/6J Mäuse bei DDC-induzierter Leberschädigung. Weibliche C57BL/6J Mäuse wurden für 72 h mit DDC gefüttert und parallel mit dem Ahr-Agonisten ITE oder Vehikel behandelt (jeweils $n = 4$). Zellsuspensionen von Lebern und Milzen wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert. (A) Anteile $CD3^+CD4^+$ an $CD45^+$ Zellen in Leber und (B) Milz. (C) Anteile $CD8^+CD4^+$ an $CD45^+$ Zellen in Leber und (D) Milz. (E) Anteile $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ an $CD45$ Zellen in Leber und (F) Milz.

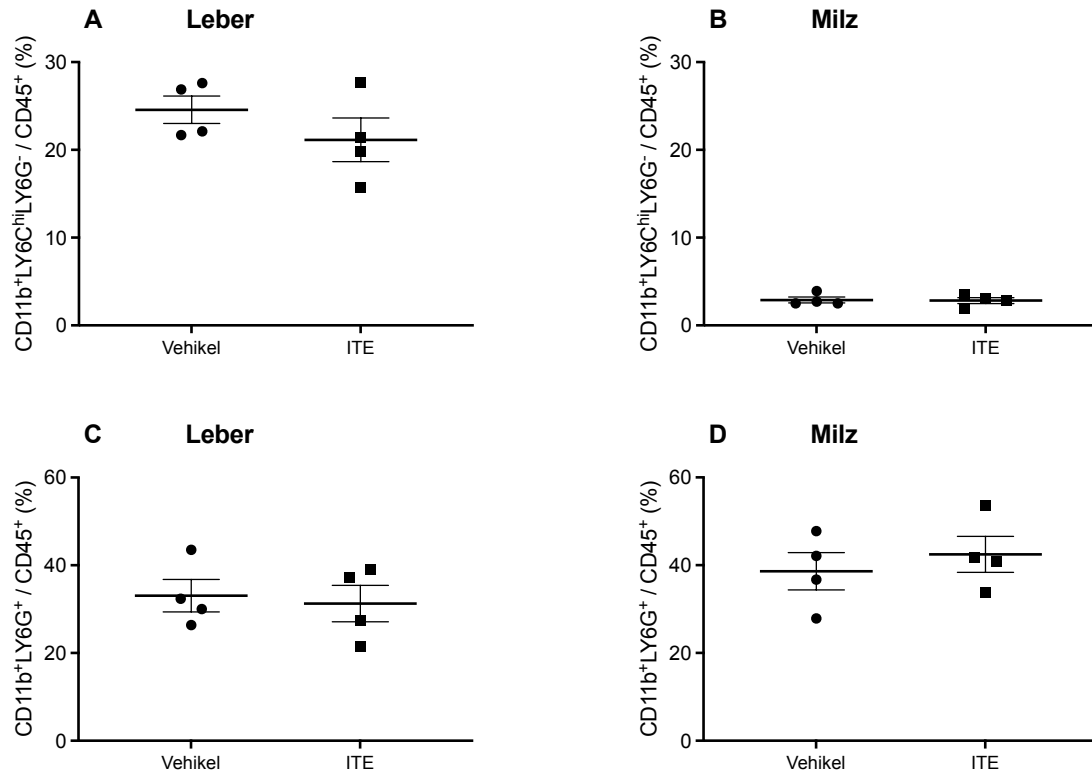


Abbildung 17: Durchflusszytometrische Analyse der Neutrophilen und Monozyten in Leber und Milz ITE-behandelter C57BL/6J Mäuse bei DDC-induzierter Leberschädigung. Weibliche C57BL/6J Mäuse wurden für 72 h mit DDC gefüttert und parallel mit dem Ahr-Agonisten ITE oder Vehikel behandelt (jeweils n = 4). Zellsuspensionen von Lebern und Milzen wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert. **(A)** Anteile der Monozyten (CD11b⁺LY6C^{hi}LY6G⁻) an CD45⁺ Zellen in Leber und **(B)** Milz. **(C)** Anteile der Neutrophilen (CD11b⁺LY6G⁺) an CD45⁺ Zellen in Leber und **(D)** Milz.

3.4.2. Ahr bei Leberschädigung im Mdr2^{-/-} Modell

Mdr2 vermittelt in Hepatozyten die kanalikuläre Sekretion von Phospholipiden, die in der gesunden Leber gemeinsam mit Cholesterin die tensidische Wirkung von Gallensäuren abschwächen. Mdr2^{-/-} Mäuse zeigen durch erhöhte intraduktale Konzentrationen freier Gallensäuren eine über mehrere Monate progrediente chronisch-toxische sklerosierende Cholangitis (Fickert et al. 2004).

3.4.2.1. Behandlung mit ITE

Junge Mdr2^{-/-} Mäuse, in denen die für das Modell typische Gallengangentzündung bereits ausgeprägt war, wurden systemisch mit dem Ahr-Agonisten ITE behandelt, um einen möglichen therapeutischen Effekt der Ahr-Aktivierung in der Cholangitis zu untersuchen. Hierzu wurden sechs Wochen alte weibliche Tiere über fünf Tage mit ITE behandelt. Die Tiere erhielten in Abständen von 48 h drei i.p. Injektionen von jeweils 200 µg ITE oder als Vehikelkontrolle von Maisöl. 24 h nach der dritten Behandlung wurden die Tiere getötet, die Serum-Transaminasenaktivitäten bestimmt und NPCs der Lebern und Milzen durchflusszytometrisch analysiert.

Die Transaminasenaktivitäten aller Tiere waren erhöht, ein signifikanter Einfluss von ITE zeigte sich nicht (AST: p > 0,99; ALT: p = 0,49) (Abbildung 18).

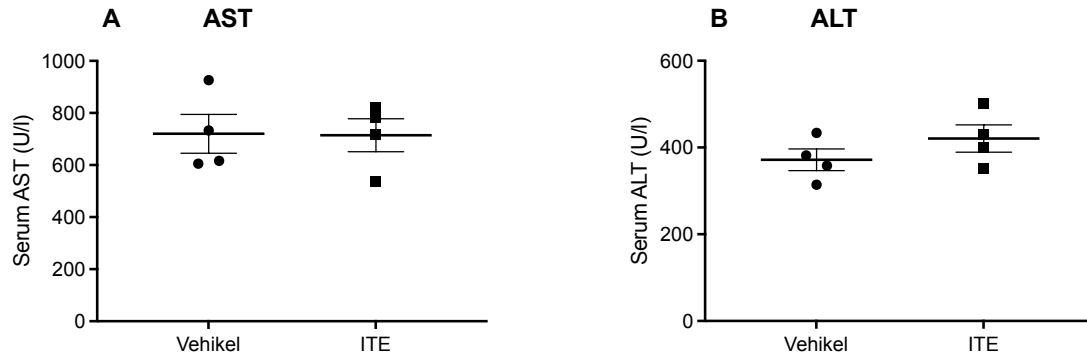


Abbildung 18: Serum-Transaminasenaktivitäten bei ITE-behandelten $Mdr2^{-/-}$ Mäusen. Sechs Wochen alte weibliche $Mdr2^{-/-}$ Mäuse wurden dreimal in Abständen von je 48 h mit ITE oder Vehikel behandelt und weitere 24 h später getötet (jeweils $n = 4$). **(A)** AST-Serumaktivität. **(B)** ALT-Serumaktivität.

Der Anteil neutrophiler Granulozyten ($CD11b^{+}Ly6G^{+}$) im Leberinfiltrat und in Milzen ITE-behandelter Tiere war signifikant erhöht (jeweils $p = 0,03$), bei den Monozyten ($CD11b^{+}Ly6G^{hi}Ly6C^{hi}$) zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Leber: $p = 0,2$; Milz: $p = 0,46$) (Abbildung 19). Die Häufigkeiten der durchflusszytometrisch betrachteten T-Zell-Kompartimente ($CD4^{+}$, $CD8^{+}$ und $CD25^{+}Foxp3^{+}$) unterschieden sich ebenfalls nicht ($CD4^{+}$ Leber: $p = 0,97$; $CD4^{+}$ Milz: $p = 0,34$; $CD8^{+}$ Leber: $p = 0,69$; $CD8^{+}$ Milz: $p = 0,89$; $CD25^{+}Foxp3^{+}$ Leber: $p = 0,37$; $CD25^{+}Foxp3^{+}$ Milz: $p = 0,63$) (Abbildung 20).

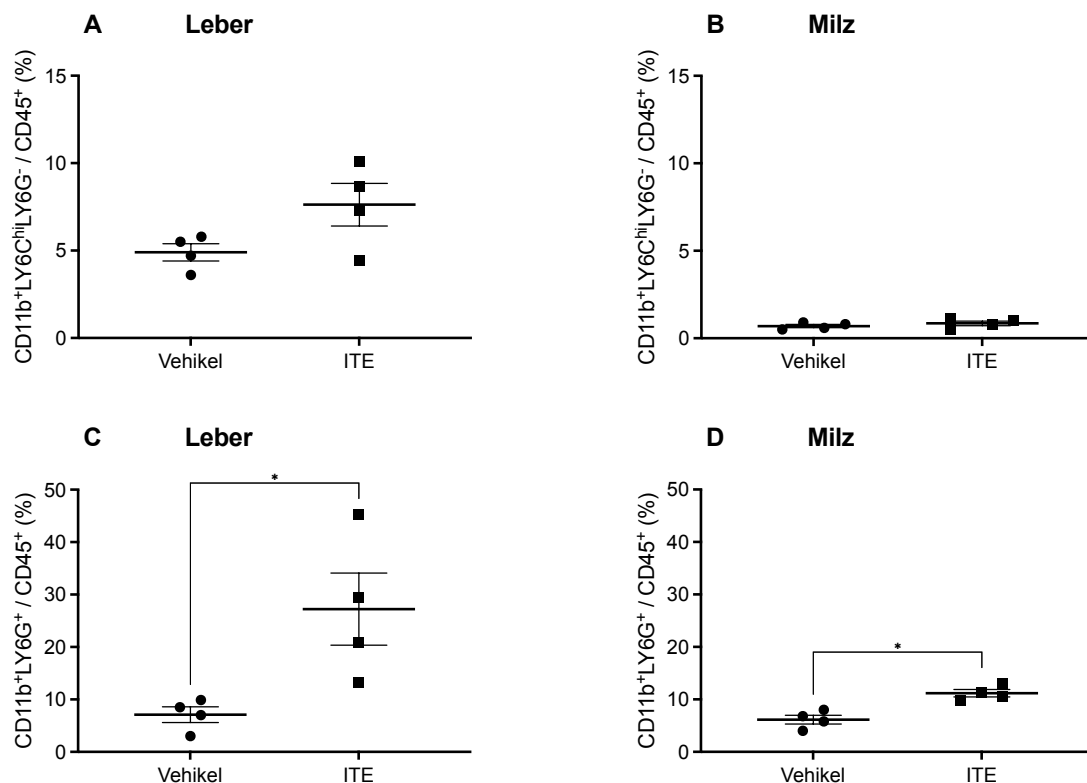


Abbildung 19: Durchflusszytometrische Analyse der Monozyten und Neutrophilen in Leber und Milz ITE-behandelter $Mdr2^{-/-}$ Mäuse. Sechs Wochen alte weibliche $Mdr2^{-/-}$ Mäuse wurden dreimal in Abständen von 48 h mit ITE oder Vehikel behandelt und weitere 24 h später getötet (jeweils $n = 4$). Zellsuspensionen von Lebern und Milzen wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert. **(A)** Anteile der Monozyten ($CD11b^{+}Ly6C^{hi}Ly6G^{-}$) an $CD45^{+}$ Zellen in Leber und **(B)** Milz. **(C)** Anteile der Neutrophilen ($CD11b^{+}Ly6G^{+}$) an $CD45^{+}$ Zellen in Leber und **(D)** Milz. *: $p \leq 0,05$.

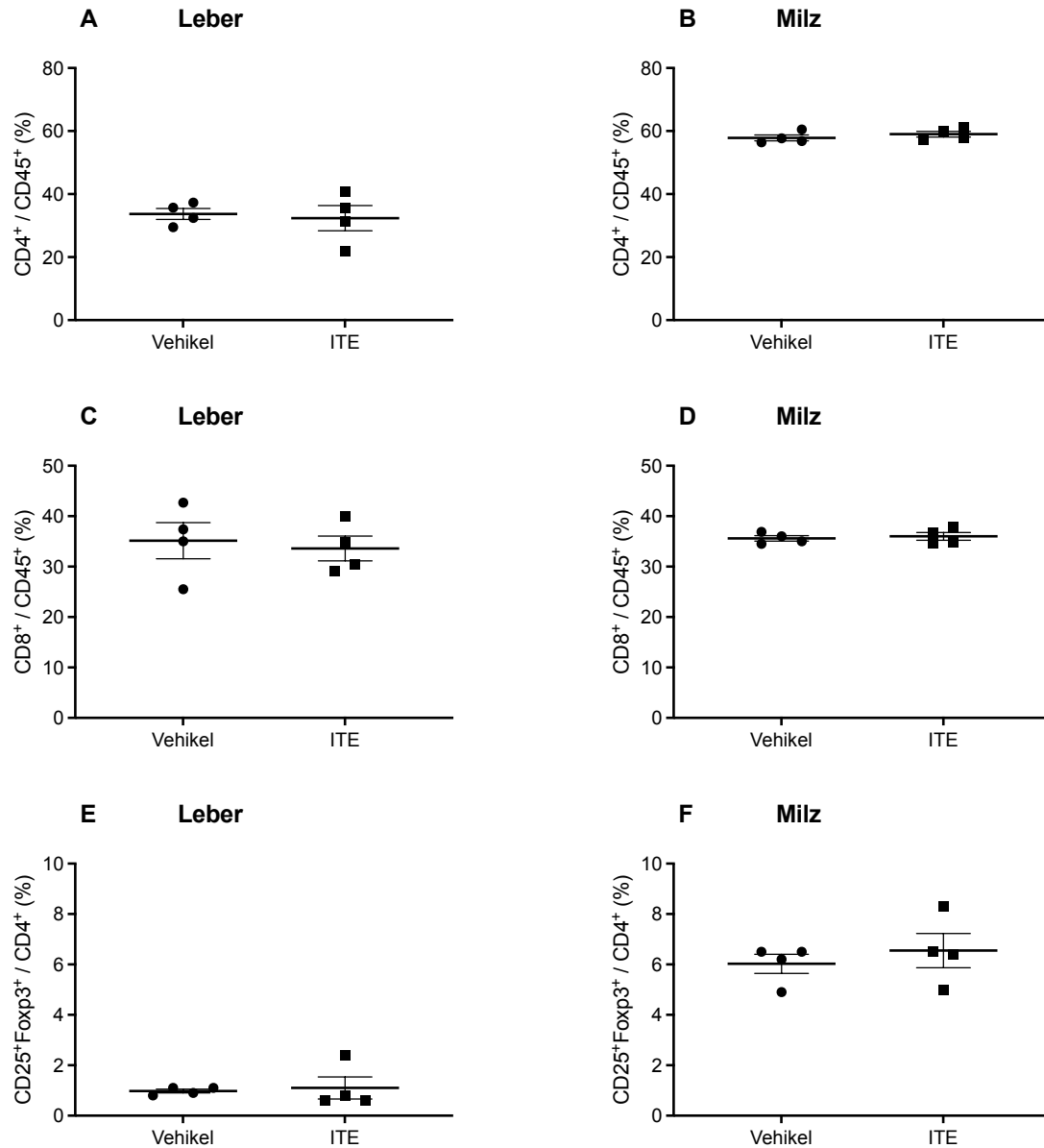


Abbildung 20: Durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Populationen in Leber und Milz ITE-behandelter *Mdr2*^{-/-} Mäuse. Sechs Wochen alte weibliche *Mdr2*^{-/-} Mäuse wurden dreimal in Abständen von 48 h mit ITE oder Vehikel behandelt und weitere 24 h später getötet (jeweils n = 4). Zellsuspensionen von Lebern und Milzen wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert. **(A)** Anteile CD4⁺ an CD45⁺CD3⁺ Zellen in Leber und **(B)** Milz. **(C)** Anteile CD8⁺ an CD45⁺CD3⁺ Zellen in Leber und **(D)** Milz. **(E)** Anteile CD25⁺Foxp3⁺ an CD3⁺CD4⁺ Zellen in Leber und **(F)** Milz.

3.4.2.2. Konditionelle Ahr-Knockouts in Leberzellen

Eine kurzfristige systemische Behandlung sechs Wochen alter $Mdr2^{-/-}$ Tiere mit ITE hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Serum-Transaminasenaktivität oder auf die Zusammensetzung der analysierten Immunzellpopulationen im Lebergewebe. Um eine mögliche Rolle des Ahr im Verlauf der chronischen Cholangitis weiter zu untersuchen, sollten weibliche und männliche $Mdr2^{-/-}$ Mäuse mit konditionellem Ahr Knockout in verschiedenen Leberzellen (Hepatozyten: $Mdr2^{-/-}$ Ahr $^{\Delta Alb}$; Endothelzellen: $Mdr2^{-/-}$ Ahr $^{\Delta Cdh5}$; DCs: $Mdr2^{-/-}$ Ahr $^{\Delta Itgax}$; KCs: $Mdr2^{-/-}$ Ahr $^{\Delta LysM}$) generiert und zu verschiedenen Zeitpunkten hinsichtlich Leberentzündung und Leberfibrose analysiert werden. Als Kontrolle dienten jeweils Gruppen gleichgeschlechtlicher und gleichaltriger $Mdr2^{-/-}$ Wurfgeschwister mit funktionellem Ahr ($Mdr2^{-/-}$ Ahr $^{fl/fl}$).

Die Tiere sollten in drei Lebensaltern untersucht werden, in denen zunächst eine progrediente Entzündungsphase (vier und acht Wochen) und schließlich eine ausgeprägte Fibrose (zwölf Wochen) zu erwarten war. Serum-Transaminasenaktivitäten wurden ermittelt und HE- und Sirius Rot-gefärbte FFPE-Schnitte der Leber angefertigt. Ziel war ursprünglich, eine Stichprobengröße von sechs Tieren je Geschlecht, konditionellem Knockout und Alter und jeweils identisch vielen gleichaltrigen Kontrollen zu erreichen. Es konnten jedoch im laufenden Versuch kaum Ahr-abhängige Unterschiede festgestellt werden, sodass von diesem Umfang abgesehen wurde. Transaminasenaktivitäten und leberhistologische Befunde wurden nur in vollständigen Gruppen erfasst, aus Ahr $^{\Delta LysM}$ Tieren liegen keine ausreichenden Daten vor. Die schlussendliche Gruppenverteilung und klinische Daten aller Tiere (Körpergewicht, Leber-/Körpergewichtverhältnis) sind im Anhang aufgeführt (Tabelle 14 und Abbildung 29).

Die histologischen Befunde aller untersuchten Genotypen zeigten bei Tieren beider Geschlechter progrediente portale fibröse Expansion und septale Fibrosierung. In einzelnen acht Wochen alten $Mdr2^{-/-}$ Ahr $^{\Delta Cdh5}$ Tieren beider Geschlechter zeigten sich diese Veränderungen tendenziell ausgeprägter als in Kontrollen, mutmaßlich im Sinne eines additiven Effektes der beiden Knockouts (Lommetz 2022). Darüber hinaus hatten die konditionellen Ahr-Knockouts jeweils keinen ersichtlichen Effekt auf den Progress. Auf ein systematisches histologisches Scoring wurde verzichtet. Im Folgenden sind repräsentative histologische Untersuchungen acht Wochen alter weiblicher Tiere dargestellt (Abbildung 21 und Abbildung 22).

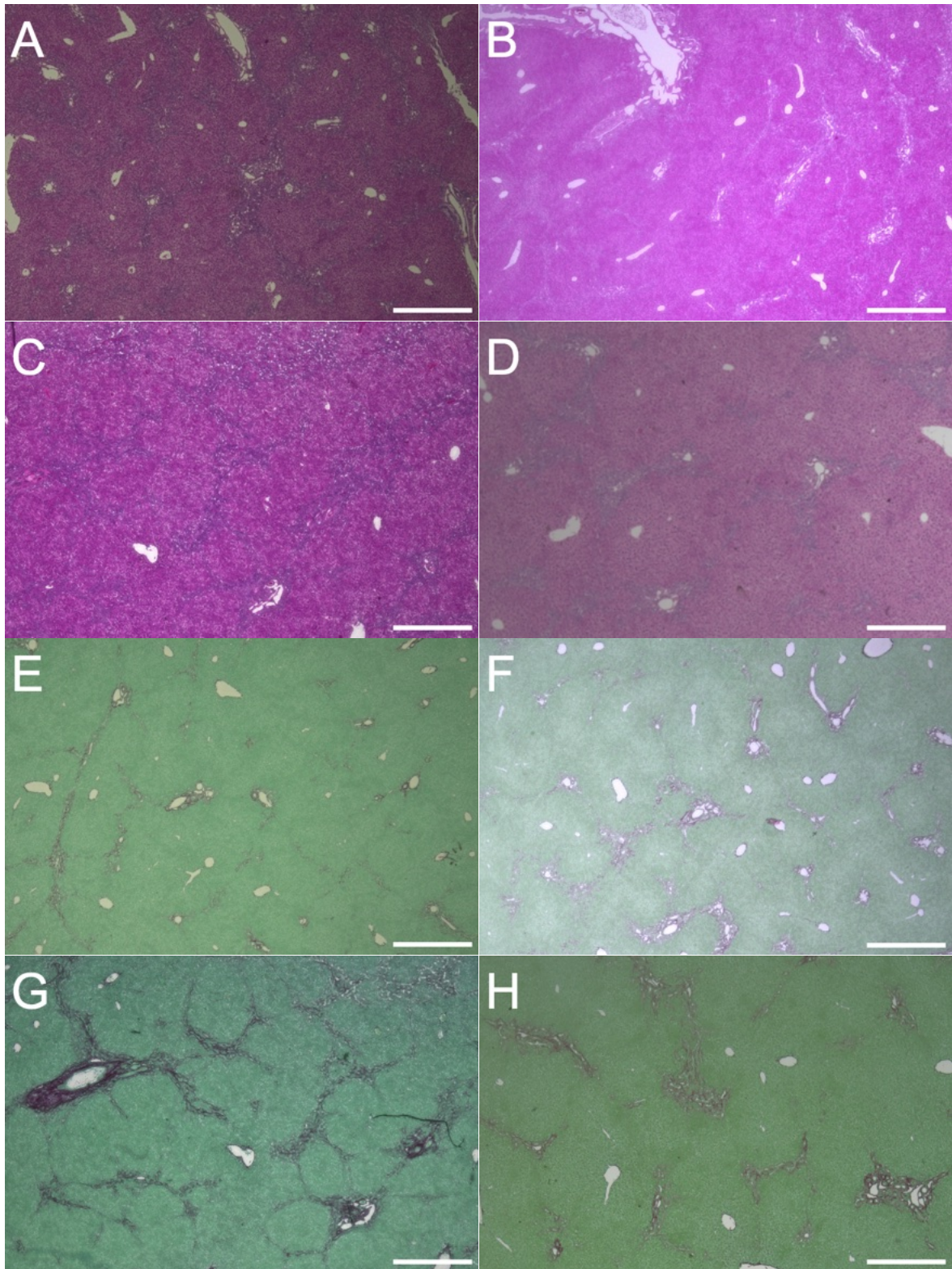


Abbildung 21: Histologische Veränderungen bei $Mdr2^{-/-}$ Mäusen mit konditionellen Ahr-Knockouts in Leberzellen (Übersichtsaufnahmen). Dargestellt sind repräsentative histologische Befunde mit Leber-Übersichtsaufnahmen acht Wochen alter weiblicher $Mdr2^{-/-}$ Mäuse mit konditionellen Ahr-Knockouts in Hepatozyten ($Ahr^{\Delta Alb}$), Endothelzellen ($Ahr^{\Delta Cdh5}$), CD11c+ dendritischen Zellen ($Ahr^{\Delta Itgax}$) und Kontrollen ohne Ahr-Knockouts ($Ahr^{fl/fl}$). Hämatoxylin-Eosin- (A bis D) und Sirius Rot- (E bis H) gefärbte Leberschnitte. (A, E) $Ahr^{fl/fl}$. (B, F) $Ahr^{\Delta Alb}$. (C, G) $Ahr^{\Delta Cdh5}$. (D, H) $Ahr^{\Delta Itgax}$. Maßstabsleisten 500 μm .

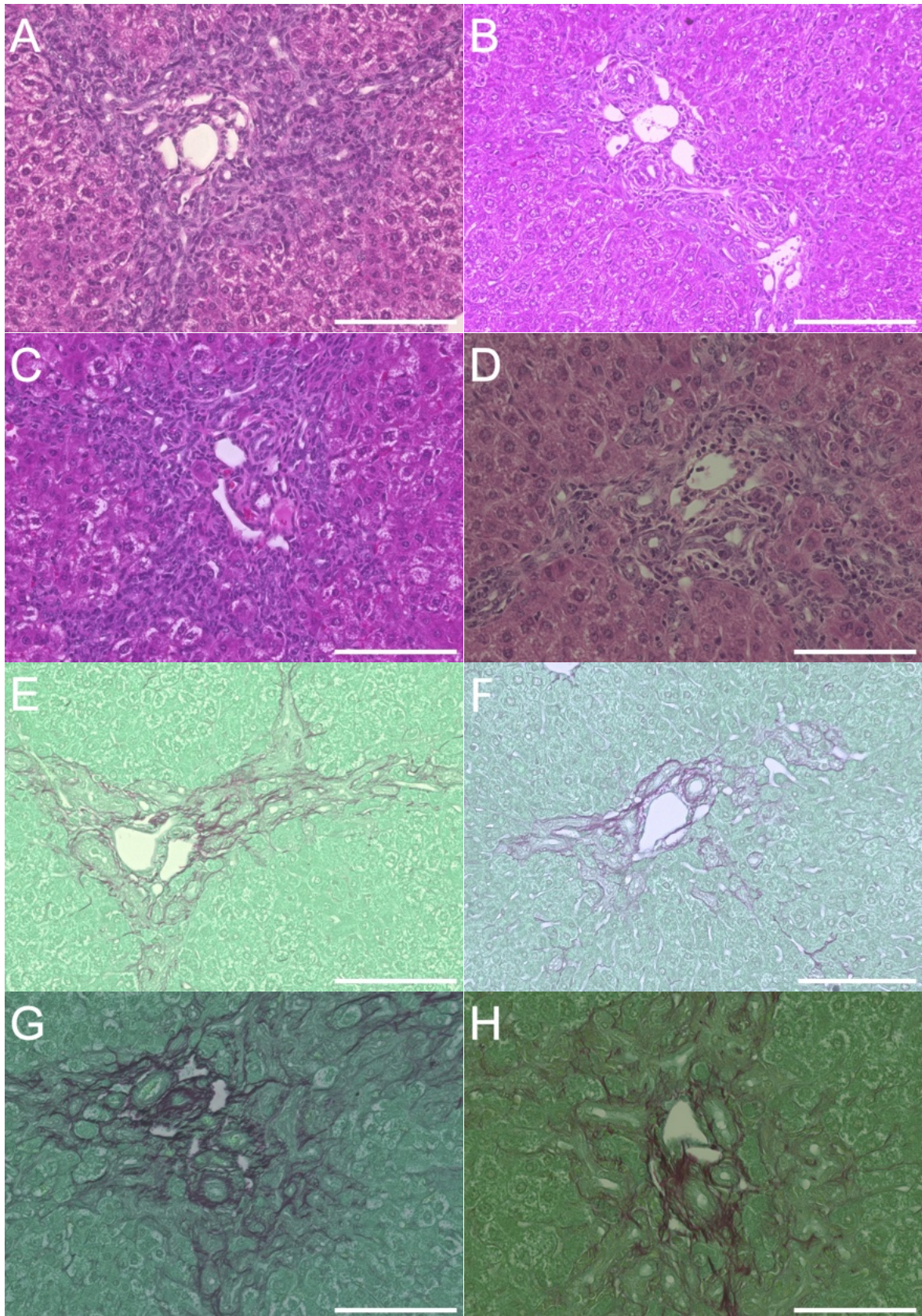


Abbildung 22: Histologische Veränderungen bei $Mdr2^{-/-}$ Mäusen mit konditionellen Ahr-Knockouts in Leberzellen (Portalfelder). Dargestellt sind repräsentative histologische Befunde mit Aufnahmen von Portalfeldern acht Wochen alter weiblicher $Mdr2^{-/-}$ Mäuse mit konditionellen Ahr-Knockouts in Hepatozyten ($Ahr^{\Delta Alb}$), Endothelzellen ($Ahr^{\Delta Cdh5}$), CD11c+ dendritischen Zellen ($Ahr^{\Delta Itgax}$) und Kontrollen ohne Ahr-Knockouts ($Ahr^{fl/fl}$). Hämatoxylin-Eosin- (A bis D) und Sirius Rot- (E bis H) gefärbte Leberschnitte. (A, E) $Ahr^{fl/fl}$. (B, F) $Ahr^{\Delta Alb}$. (C, G) $Ahr^{\Delta Cdh5}$. (D, H) $Ahr^{\Delta Itgax}$. Maßstabsleisten 100 μm .

Vier Wochen alte weibliche $Ahr^{\Delta Cdh5}$ Mäuse wiesen eine höhere AST-Aktivität auf als Kontrollen ($p = 0,004$), ansonsten zeigten sich bei den Serum-Transaminasenaktivitäten keine signifikanten Unterschiede (weibliche acht Wochen alte $Ahr^{\Delta Alb}$ AST und ALT: $p = 0,84$ und $p = 0,22$; weibliche vier Wochen alte $Ahr^{\Delta Cdh5}$ ALT: $p = 0,76$; weibliche acht Wochen alte $Ahr^{\Delta Cdh5}$ AST und ALT: $p = 0,61$ und $p = 0,05$; männliche acht Wochen alte $Ahr^{\Delta Cdh5}$ AST und ALT: $p = 0,31$ und $p = 0,82$; weibliche vier Wochen alte $Ahr^{\Delta Itgax}$ AST und ALT: $p = 0,15$ und $p = 0,10$; weibliche acht Wochen alte $Ahr^{\Delta Itgax}$ AST und ALT: $p = 0,55$ und $p = 0,90$; männliche vier Wochen alte $Ahr^{\Delta Itgax}$ AST und ALT jeweils: $p = 0,45$; männliche acht Wochen alte $Ahr^{\Delta Itgax}$ AST und ALT: $p = 0,35$ und $p = 0,48$). Drei Ausreißer, jeweils mit zweiter Serum-Transaminasenaktivität und histologischem Bild ohne Anhalt für einen tatsächlich ausgeprägteren Leberschaden, wurden vorab von der Analyse ausgeschlossen (AST 3078,57 U/l eines weiblichen vier Wochen alten $Ahr^{\Delta Cdh5}$ Tiers; ALT 886,49 U/l eines anderen weiblichen vier Wochen alten $Ahr^{\Delta Cdh5}$ Tiers; AST 1785,98 U/l einer weiblichen acht Wochen alten $Ahr^{fl/fl}$ Kontrolle für $Ahr^{\Delta Cdh5}$) (Abbildung 23).

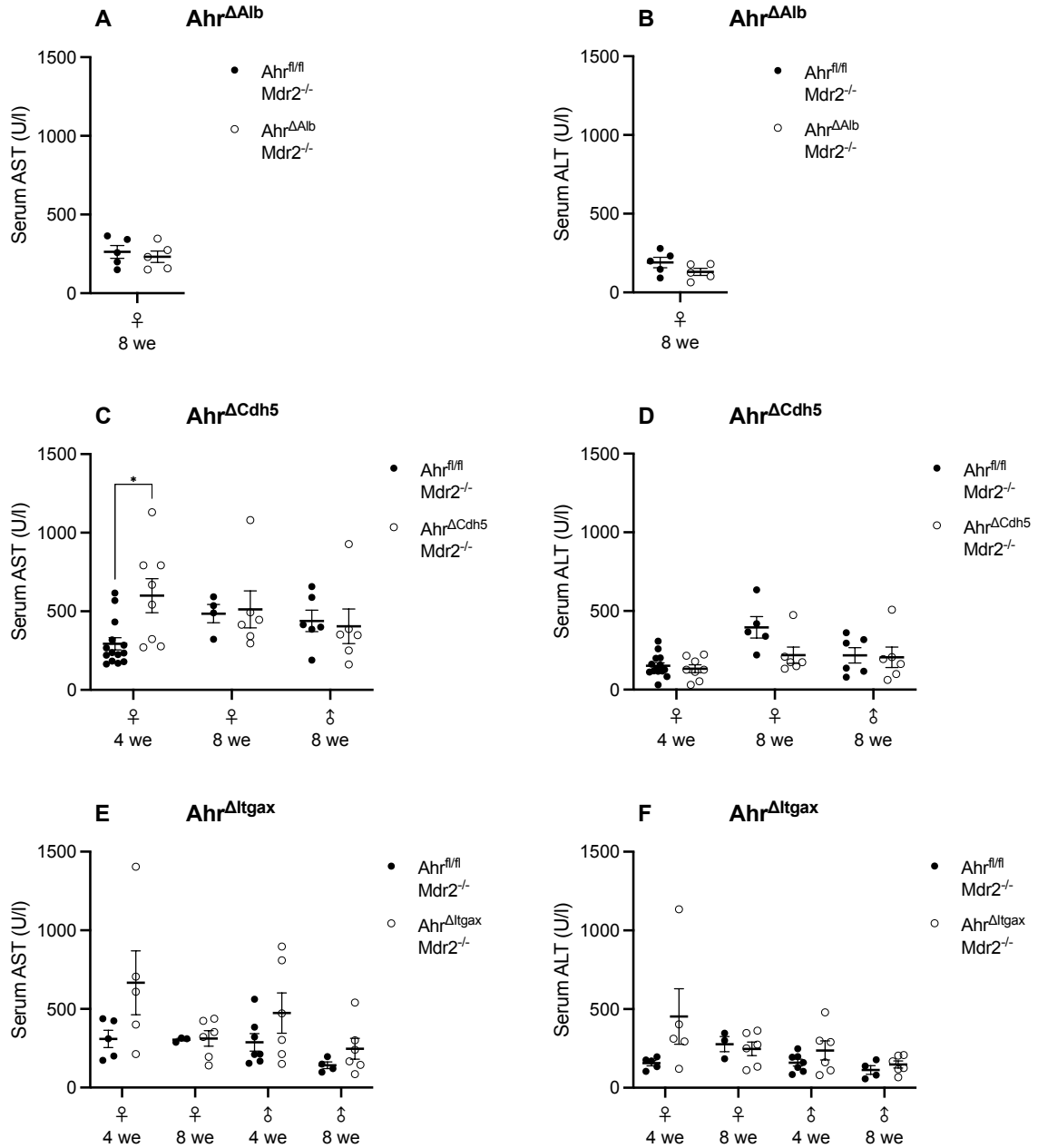


Abbildung 23: Serum-Transaminasenaktivitäten bei Mdr2^{-/-} Mäusen mit konditionellen Ahr-Knockouts in Leberzellen. Weibliche (♀) und männliche (♂) Mdr2^{-/-} Mäuse mit konditionellen Ahr-Knockouts in Hepatozyten (Ahr Δ Alb), Endothelzellen (Ahr Δ Cdh5), CD11c⁺ dendritischen Zellen (Ahr Δ Itgax) und Kontrollen ohne Ahr-Knockouts (Ahr^{fl/fl}) gleichen Geschlechts wurden zu bis zu zwei Zeitpunkten (vier und acht Wochen) analysiert (weibliche acht Wochen alte Ahr Δ Alb und Kontrollen jeweils: n = 5; weibliche vier Wochen alte Ahr Δ Cdh5 und Kontrollen: n = 8 und n = 14; weibliche acht Wochen alte Ahr Δ Cdh5 und Kontrollen: n = 6 und n = 5; weibliche vier Wochen alte Ahr Δ Itgax und Kontrollen jeweils: n = 5; weibliche acht Wochen alte Ahr Δ Itgax und Kontrollen: n = 6 und n = 3; männliche vier Wochen alte Ahr Δ Itgax und Kontrollen: n = 6 und n = 7; männliche acht Wochen alte Ahr Δ Itgax und Kontrollen: n = 6 und n = 4; alle weiteren jeweils: n = 6). **(A)** AST- und **(B)** ALT- Serumaktivität bei Mdr2^{-/-} Ahr Δ Alb. **(C)** AST- und **(D)** ALT- Serumaktivität bei Mdr2^{-/-} Ahr Δ Cdh5. **(E)** AST- und **(F)** ALT- Serumaktivität bei Mdr2^{-/-} Ahr Δ Itgax. *: p ≤ 0,05.

3.4.3. Rolle des Ahr bei autoimmuner Cholangitis (K14-OVAp-Modell)

Im K14-OVAp-Mausmodell wurde ein möglicher Effekt des Ahr-Liganden ITE im Rahmen einer T-Zell-vermittelten akuten autoimmunen Cholangitis getestet. K14-OVAp Mäuse exprimieren das Ovalbuminpeptid SIINFEKL in biliären Epithelzellen. Durch adoptiven Zelltransfer SIINFEKL-spezifischer OT-1 CD8⁺ T-Zellen wird in K14-OVAp Mäusen eine akute Cholangitis induziert (Schwinge et al. 2015).

OT-1 CD8⁺ Splenozyten wurden mittels magnetischer Zellseparation isoliert. Jeweils 2×10^5 Zellen wurden 12 bis 14 Wochen alten weiblichen K14-OVAp Mäusen i.v. injiziert. 24 h vor dem Zelltransfer, zeitgleich mit dem Zelltransfer und anschließend in 48 h Abständen wurden den Versuchstieren jeweils entweder 200 µg ITE oder Maisöl (Vehikelkontrolle) i.p. injiziert. 5 d nach dem Zelltransfer wurden die Tiere getötet. Die Serum-Transaminasenaktivitäten wurden bestimmt und durchflusszytometrische Analysen der Leber- und Milz-NPCs hinsichtlich der Zusammensetzung der T-Zell Subpopulationen und der inflammatorischen Monozyten durchgeführt.

Nach anfänglicher Gewichtszunahme verloren ab dem dritten Tag nach Zelltransfer sowohl ITE-behandelte als auch Vehikel-behandelte Tiere an Körpergewicht, so wie es für das Modell typisch ist. Tendenziell war der Gewichtsverlust in ITE-behandelten Tieren ausgeprägter, ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bestand jedoch bis zum letzten Versuchstag nicht (letzter Versuchstag: $p = 0,25$) (Abbildung 24).

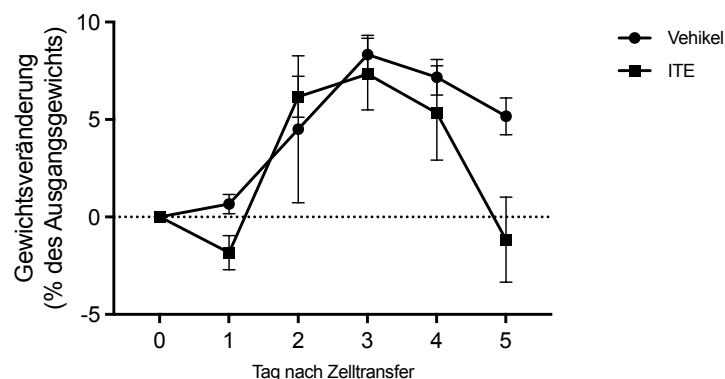


Abbildung 24: Gewichtsverläufe bei CD8⁺ T-Zell-vermittelter Cholangitis (K14-OVAp) und Behandlung mit dem Ahr-Agonisten ITE. CD8⁺ T-Zellen aus OT-1 Mäusen wurden K14-OVAp Mäusen transferriert, um durch Erkennung ihres Zielantigens SIINFEKL auf biliären Epithelzellen eine Cholangitis zu induzieren. Die Tiere wurden 24 h vor Zelltransfer, simultan zum Zelltransfer und nachfolgend in je 48 h Abständen mit ITE oder Vehikel behandelt und 5 d nach Zelltransfer getötet (jeweils $n = 6$). Dargestellt ist die Körpergewichtsveränderung relativ zum Ausgangsgewicht (Tag 0).

ITE-behandelte Tiere zeigten als Zeichen eines aggravierten Leberschadens signifikant höhere Serum-Transaminasenaktivitäten als Vehikel-Kontrollen (AST: $p = 0,03$; ALT: $p = 0,009$) (Abbildung 25).

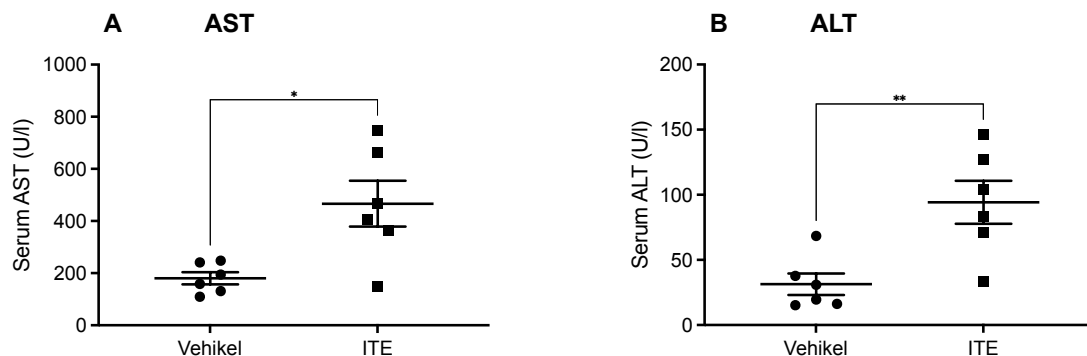


Abbildung 25: Serum-Transaminasenaktivitäten bei CD8⁺ T-Zell-vermittelter Cholangitis (K14-OVAp) und Behandlung mit dem Ahr-Agonisten ITE. CD8⁺ T-Zellen aus OT-1 Mäusen wurden K14-OVAp Mäusen transferiert, um durch Erkennung ihres Zielantigens SIINFEKL auf biliären Epithelzellen eine Cholangitis zu induzieren. Die Tiere wurden 24 h vor Zelltransfer, simultan zum Zelltransfer und nachfolgend in je 48 h Abständen mit ITE oder Vehikel behandelt (jeweils $n = 6$) und 5 d nach Zelltransfer getötet. (A) AST-Serumaktivität. (B) ALT-Serumaktivität. *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$.

Die krankheitsfördernden transferierten OT-1 T-Zellen konnten anhand ihres kongenen Markers CD45.1 von wirtseigenen CD8⁺ T-Zellen unterschieden werden. Der Anteil der OT-1 T-Zellen an allen CD8⁺ T-Zellen in Lebern ITE-behandelter Tiere war signifikant erhöht ($p = 0,03$), nicht jedoch in Milzen ($p = 0,59$). Im K14-OVAp-Modell werden endogene CD4⁺ T-Zellen in die Leber rekrutiert, die bei Transfer in gesunde K14-OVAp Mäuse auch in Abwesenheit von OT-1 CD8⁺ T-Zellen eine Leberentzündung hervorrufen (Schwinge et al. 2015). Die Dichte endogener CD4⁺ T-Zellen (bezogen auf Organgewichte) war in Milzen ITE-behandelter Tiere reduziert ($p = 0,009$), in Lebern zeigte sich kein Unterschied ($p = 0,82$) (Abbildung 26).

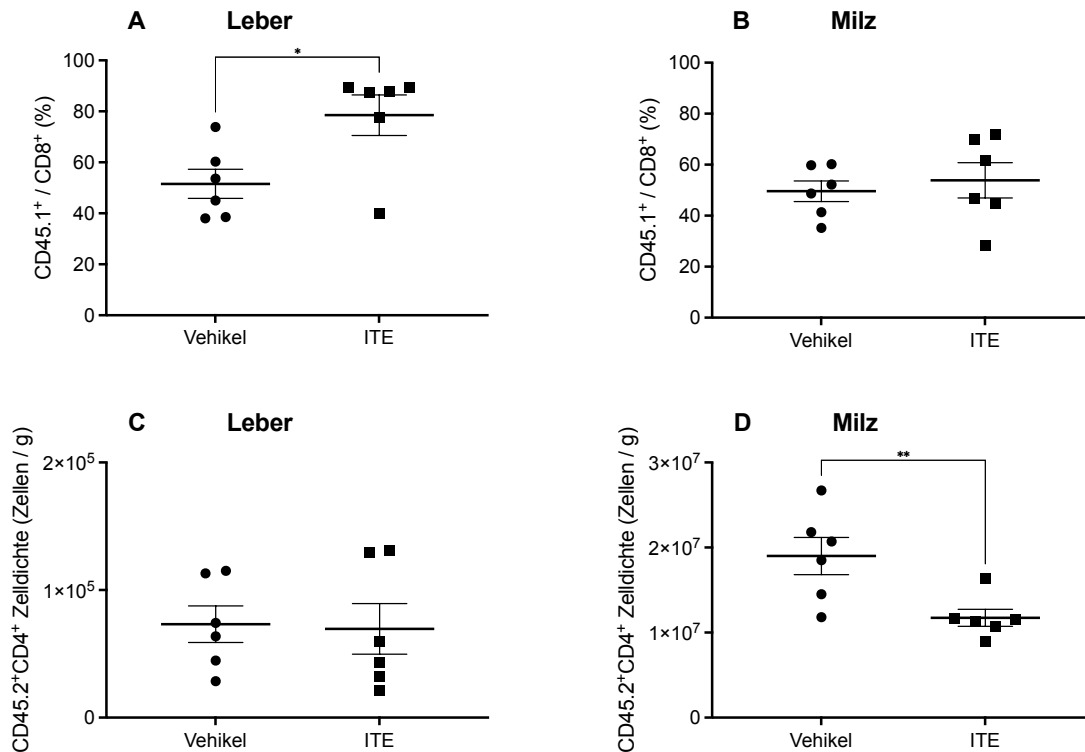


Abbildung 26: Durchflusszytometrisch bestimmte Anteile der OT-1 CD8⁺ T-Zellen und Dichte endogener CD4⁺ T-Zellen in Leber und Milz ITE-behandelter Tiere im K14-OVAp Modell. CD8⁺ T-Zellen aus OT-1 Mäusen wurden K14-OVAp Mäusen transferiert. Die Tiere wurden wiederholt mit ITE oder Vehikel (jeweils n = 6) behandelt, die Analyse erfolgte 5d nach Zelltransfer. OT-1 T-Zellen konnten anhand ihres kongenen Markers CD45.1 von endogenen CD45.2⁺ Lymphozyten unterschieden werden. **(A)** Anteile CD45.1⁺ an CD8⁺ T-Zellen in Leber und **(B)** Milz. **(C)** Dichten (bezogen auf Feuchtgewicht) CD45.2⁺CD4⁺ T-Zellen in Leber und **(D)** Milz. *: $p \leq 0,05$, ** $\leq 0,01$.

Lebern und Milzen ITE-behandelter Tiere enthielten anteilig signifikant weniger CD4⁺ T-Zellen (Leber: $p = 0,004$; Milz: $p = 0,04$). Die Population CD8⁺ T-Zellen in Lebern war insgesamt vergrößert ($p = 0,04$), ebenso die Populationen inflammatorischer Monozyten in Lebern und in Milzen (jeweils $p = 0,002$). Der Anteil neutrophiler Granulozyten im Leberinfiltrat und in Milzen war bei ITE-behandelten Tieren vermindert (Leber: $p = 0,004$; Milz: $p = 0,02$). ITE zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Anteile CD8⁺ T-Zellen in Milzen ($p = 0,16$) und CD25⁺Foxp3⁺ Tregs in Lebern ($p = 0,06$) und Milzen ($p = 0,17$) (Abbildung 27 und Abbildung 28).

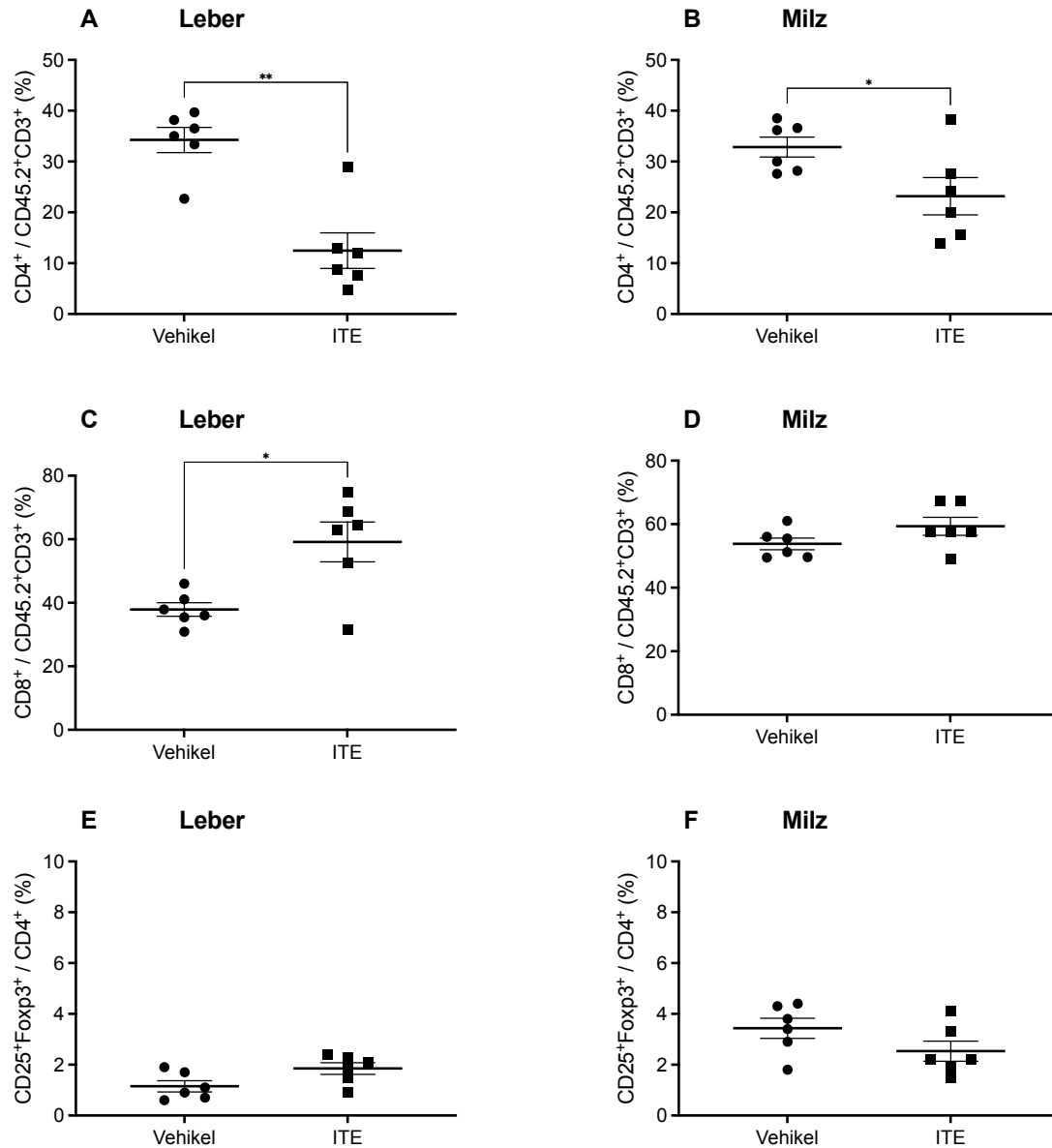


Abbildung 27: Durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Populationen in Leber und Milz ITE-behandelter Mäuse mit CD8⁺ T-Zell-vermittelter Cholangitis (K14-OVAp). CD8⁺ T-Zellen aus OT-1 Mäusen wurden K14-OVAp Mäusen transferiert. Die Tiere wurden wiederholt mit ITE oder mit Vehikel (jeweils n = 6) behandelt, die Analyse erfolgte 5d nach Zelltransfer. **(A)** Anteile CD4⁺ an CD45.2⁺CD3⁺ Zellen in Leber und **(B)** Milz. **(C)** Anteile CD8⁺ an CD45.2⁺CD3⁺ Zellen in Leber und **(D)** Milz. **(E)** Anteile CD25⁺Foxp3⁺ an CD3⁺CD4⁺ Zellen in Leber und **(F)** Milz. *: p ≤ 0,05, **: p ≤ 0,01.

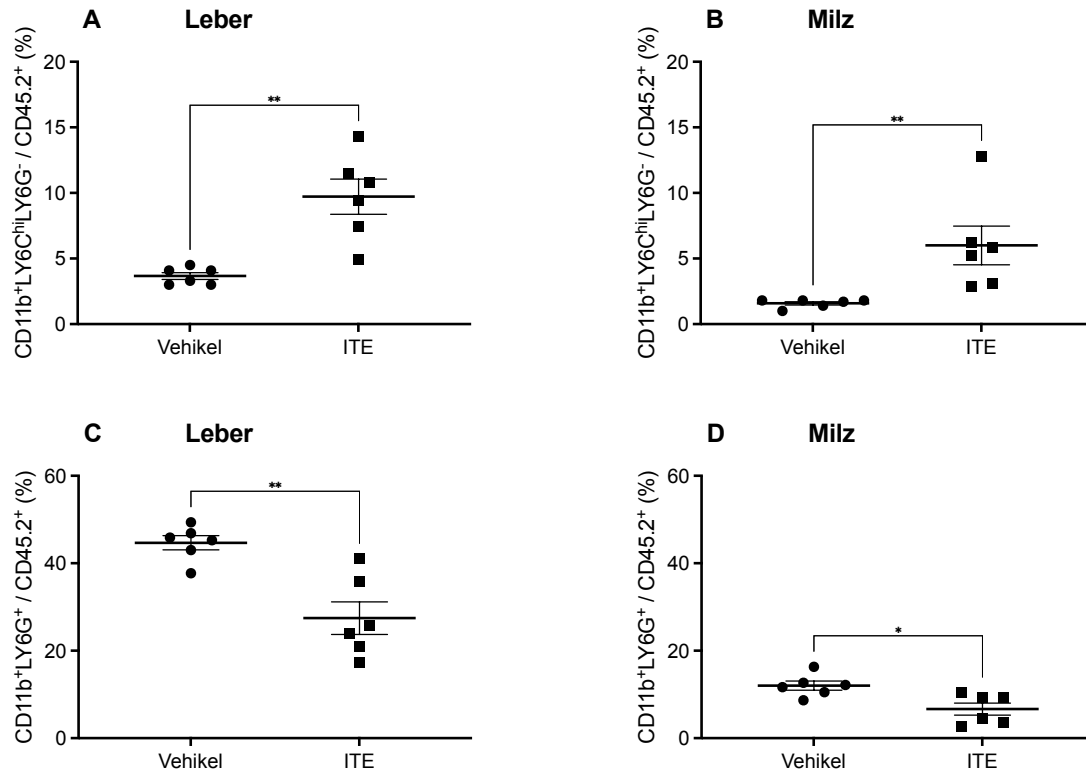


Abbildung 28: Durchflusszytometrische Analyse der Monozyten und Neutrophilen in Leber und Milz ITE-behandelter Mäuse mit CD8⁺ T-Zell-vermittelter Cholangitis (K14-OVAp). CD8⁺ T-Zellen aus OT-1 Mäusen wurden K14-OVAp Mäusen transferiert. Die Tiere wurden wiederholt mit ITE oder mit Vehikel (jeweils n = 6) behandelt, die Analyse erfolgte 5d nach Zelltransfer. **(A)** Anteile der Monozyten (CD11b⁺LY6C^{hi}LY6G⁻) an CD45.2⁺ Zellen in Leber und **(B)** Milz. **(C)** Anteile der Neutrophilen (CD11b⁺LY6G⁺) an CD45.2⁺ Zellen in Leber und **(D)** Milz. *: p ≤ 0,05, **: p ≤ 0,01.

Zusammenfassend führte eine Ahr-Aktivierung durch ITE im K14-OVAp-Modell zu einem ausgeprägteren Leberschaden. Übereinstimmend waren bei den betroffenen Tieren insbesondere mehr OT-1 CD8⁺ T-Zellen und mehr Monozyten im Leberinfiltrat nachweisbar.

4. Diskussion

Die Fähigkeit des Ahr, auf verschiedenen zellulären Ebenen Immunantworten zu regulieren und insbesondere Immuntoleranz zu fördern, macht ihn zu einer erfolgreichen und vielversprechenden Zielstruktur für die therapeutische Immunmodulation durch niedermolekulare Verbindungen, insbesondere bei Autoimmunerkrankungen und onkologischen Erkrankungen. Seine Bedeutung innerhalb des immunologischen Milieus der Leber ist hingegen wenig erforscht.

Zum einen ist von grundsätzlichem Interesse, welche physiologische Bedeutung dem Ahr bei Immunantworten der Leber zukommt, etwa bei der adaptiven Immuntoleranz. In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob Toleranzmechanismen in LSECs – im Speziellen die Induktion von Tregs und die Endotoxintoleranz – Ahr-abhängig sind. Zum anderen liegen zwar Hinweise für günstige Wirkungen von als nichttoxisch geltenden Ahr-Agonisten bei entzündlichen Lebererkrankungen vor, aber auch für eine Augmentation von Leberschädigungen. In dieser Arbeit wurden Mausmodelle entzündlicher Lebererkrankungen an Tieren mit konditionellen Ahr-Knockouts in Leberzellen angewandt oder es erfolgten systemische Behandlungen mit dem Ahr-Agonisten ITE. Ein besseres Verständnis dieser Zusammenhänge ist wichtig für das Indikations- und Sicherheitsprofil Ahr-gerichteter Therapien.

4.1. Die Induktion regulatorischer T-Zellen durch LSECs in vitro ist Ahr-abhängig

Die Induktion von Tregs ist ein aktuelles und gewichtiges Anliegen antigenspezifischer Immuntherapien für Autoimmunerkrankungen (Goswami et al. 2022). LSECs sind in vitro und in vivo in der Lage, antigenspezifische Tregs zu induzieren, die wiederum Autoimmunität wirksam kontrollieren können (Carambia et al. 2015; Carambia et al. 2014). Die Ahr-Agonisten ITE und TCDD induzieren in BMDCs in vitro und in vivo (systemische Gabe) einen tolerogenen Phänotyp, der ebenfalls antigenspezifische Tregs induziert und Autoimmunität kontrolliert (Barroso et al. 2021). Ahr-defiziente BMDCs zeigen hingegen in vitro einen inflammatorischen Phänotyp, welcher die Differenzierung von Th17-Zellen fördert und jene von Tregs beeinträchtigt (Gutiérrez-Vázquez und Quintana 2018).

Bislang lagen keine Daten darüber vor, ob der Ahr in LSECs eine vergleichbare Bedeutung hat. Diese Arbeit zeigt, dass die effiziente Induktion von Tregs durch LSECs tatsächlich ebenfalls Ahr-abhängig ist: Im in vitro Treg-Konversionsassay war die Differenzierung von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zu CD25⁺Foxp3⁺ Tregs bei Kokultur mit LSECs aus Mäusen mit Endothel-spezifischem Ahr-Knockout (Ahr^{ΔCdh5}) erheblich beeinträchtigt. In DCs der Leber hatte ein Ahr-Knockout (Ahr^{ΔItgax}) hingegen den gegenteiligen, in DCs aus Milzen keinen Effekt (Abbildung 8).

Diese Beobachtungen sollten zukünftig durch weitere experimentelle Designs gestützt werden, etwa durch pharmakologische Aktivierung oder Antagonisierung des Ahr. Das hier gewählte Mausmodell eignet sich dafür möglicherweise nur eingeschränkt: Genetische Grundlage der in dieser Arbeit für konditionelle Knockouts verwendeten Ahr^{fl/fl} Mäuse ist das Allel Ahr^d. Es kodiert für einen Ahr mit geringerer Ligandenaffinität als das in C57BL/6 kongenitale Allel Ahr^{b-1} (Poland et al. 1994). In Ahr^d BMDCs beschreiben Quintana et al. (2010)

eine fehlende Wirksamkeit des Ahr-Agonisten ITE auf die Induktion von Tregs. Interessanterweise erwiesen sich Ahr^{fl/fl} LSECs in dieser Arbeit allerdings als vergleichbar herausragend effiziente Treg-Induktoren wie zuvor für LSECs mit Ahr^{b-1} beschrieben (Abbildung 8, Carambia et al. 2014). Möglicherweise ist in LSECs demnach nur eine basale oder eine Liganden-unabhängige Ahr-Aktivität erforderlich. Zur Klärung könnten Treg-Konversionsassays mit direktem Vergleich von LSECs mit hochaffinem Ahr und Ahr-defizienten Zellen dienen – zum Beispiel mithilfe von Ahr^{-/-} Mäusen oder einer jüngst generierten entsprechenden flox-Linie (Wilson et al. 2021).

Mögliche Mechanismen Ahr-vermittelter Modulation der Treg-Induktion durch LSECs wurden in dieser Arbeit nicht untersucht. In DCs steigern Ahr-Agonisten die Fähigkeit, tolerogene Tregs zu induzieren, abhängig von einer gesteigerten IDO-Aktivität (Vogel et al. 2008) und von einer gesteigerten Retinsäure-Produktion (Quintana et al. 2010). Beide Mechanismen könnten durch pharmakologische IDO-Inhibition beziehungsweise durch Retinsäure-Antagonisten in LSECs überprüft werden. TCDD und ITE induzieren in DCs ferner die Expression von TGF- β und modulieren die Expression kostimulatorischer Moleküle und proinflammatorischer Zytokine in DCs (Simones und Shepherd 2011; Quintana et al. 2010; Bankoti et al. 2010). Die entsprechenden Profile sollten zukünftig auch in LSECs mit der Expression und Aktivierung des Ahr korreliert werden.

Durch gezielte Bereitstellung von Autoantigen an LSECs mittels Nanopartikeln lassen sich in vivo antigenspezifische Tregs expandieren und Autoimmunität kontrollieren (Carambia et al. 2015). Möglicherweise ist dieser experimentelle Therapieansatz geeignet, eine funktionelle Relevanz des Ahr in LSECs bei Treg-vermittelter Immuntoleranz nachzuweisen, indem Versuchstiere mit konditionellem Ahr-Knockout in LSECs behandelt werden oder simultan zu Antigen-gebundenen Nanopartikeln Ahr-Liganden (systemisch oder ebenfalls Nanopartikel-gebunden) appliziert werden.

LSECs sind auch über die Induktion antigenspezifischer Tregs hinaus in der Lage, adaptive Toleranz zu vermitteln. Zirkulierende CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen interagieren in vivo regelmäßig mit LSECs (Guidotti et al. 2015; Carambia et al. 2013). In vitro inhibieren LSECs die Sekretion von IFN- γ und IL-17 durch CD4⁺ T-Zellen, erforderlich sind IL-10 und ein intakter Programmed cell death protein 1 (PD-1)/Programmed death-ligand 1 (PD-L1) Signalweg (Carambia et al. 2013). IL-10 wird in der Leber insbesondere von KCs sezerniert und limitiert entzündliche Immunantworten (Ellett et al. 2010; Yokoyama et al. 2004; Emmanuilidis et al. 2001). In CD8⁺ T-Zellen induzieren LSECs in vitro und in vivo über den PD-1/PD-L1 Signalweg einen tolerogenen Phänotyp (Carambia et al. 2021; Diehl et al. 2008). Der Ahr kommt hier jeweils als Modulator infrage: Die Sekretion von IL-10 durch inflammatorische Makrophagen ist Ahr-abhängig (Shinde et al. 2018; Kimura et al. 2009) und kanzerogene Ahr-Agonisten induzieren PD-L1 in bronchialem Epithel (Wang et al. 2019). In erster Linie sollten Ahr-abhängige Effekte auf LSEC-Ebene geprüft werden. Dazu bieten sich LSEC/T-Zell-Kokulturen – zum einen mit Ahr-defizienten LSECs, zum anderen nach (Vor-) Behandlungen mit Ahr-Liganden – und nachfolgende T-Zell-Aktivierungs-, Proliferations- und Zytotoxizitäts-Assays an.

4.2. Ambivalente Daten zur Rolle des Ahr bei der Endotoxin-Toleranz in LSECs

Eine vorangehende Arbeit zeigte, dass $Ahr^{\Delta Cdh5}$ LSECs in vitro eine beeinträchtigte Endotoxintoleranz mit vermehrter Sekretion von IL-6 auf LPS-Stimulus aufweisen. Übereinstimmend schwächten die Ahr-Agonisten ITE, FICZ, wider Erwarten aber auch der Ahr-Antagonist CH223191, die IL-6-Antwort auf LPS in Ahr^{b-1} LSECs C57BL/6 Mäusen ab. TCDD zeigte keinen Einfluss. Daraus resultierte die Annahme, CH223191 sei möglicherweise kein reiner Ahr-Antagonist, sondern wirke in den verwendeten Konzentrationen agonistisch (Lommetz 2022). In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt der genannten Ahr-Liganden auch in $Ahr^{\Delta Cdh5}$ LSECs untersucht.

Zum einen konnte reproduziert werden, dass $Ahr^{\Delta Cdh5}$ LSECs auf LPS mit einer stärkeren IL-6-Antwort reagieren als $Ahr^{fl/fl}$ LSECs. In $Ahr^{fl/fl}$ LSECs, also Zellen mit niedrigaffinem Ahr, zeigte eine Behandlung mit den Ahr-Agonisten ITE, FICZ, L-Kyn und TCDD keinen Effekt auf die LPS-induzierte IL-6-Antwort (Abbildung 5), hingegen zeigte sich vorbeschriebene dosisabhängige Suppression durch CH223191 (Abbildung 6). In LSECs aus Mäusen mit Ahr^{b-1} konnte die suppressive Wirkung von CH223191 ebenfalls reproduziert werden, nicht jedoch jene von ITE (Abbildung 7). Zum anderen zeigten ITE und CH223191 wider Erwarten auch in $Ahr^{\Delta Cdh5}$ LSECs eine supprimierende Wirkung (Abbildung 6). Insbesondere augmentierte der prototypische Ahr-Agonist TCDD in $Ahr^{\Delta Cdh5}$ LSECs, nicht aber in $Ahr^{fl/fl}$ LSECs, die IL-6-Antwort auf LPS (Abbildung 5 und Abbildung 6). Gegen die postulierte agonistische Wirkung von CH223191 am Ahr sprechen ferner pharmakologische Untersuchungen. Demnach wirkt CH223191, auch in erheblich höheren als den hier verwendeten Dosierungen, sowohl spezifisch als auch rein antagonistisch am Ahr (Zhao et al. 2010; Kim et al. 2006). Zwar sind Ahr-unabhängige Effekte von ITE, CH223191 und auch TCDD in anderen Kontexten durchaus beschrieben (Choi et al. 2012; Lehmann et al. 2011; Park et al. 2003) und in gegebener Konstellation nicht auszuschließen, in erster Linie erfordert die biologische Wirkung mehrerer Ahr-Agonisten in einer Knockout-Zelllinie jedoch eine Validierung des konditionellen Knockouts und des Isolationsprozesses.

Konditionelle Ahr-Knockouts wurden in dieser Arbeit mittels Cre-loxP-Systems generiert. Das für LSECs genutzte Cre Transgen wird unter dem Cadherin 5-Promoter panendothelial und im größten Teil der hämatopoetischen Zellen exprimiert (Payne et al. 2018). Dieser Arbeit vorangehend wurde der Knockout in LSECs mittels Real-Time PCR in magnetisch separierten $CD146^+$ NPCs der Leber validiert (unveröffentlicht) und in dieser Arbeit verwendete Mäuse wurden fortwährend genotypisiert, sodass zusammenfassend kein Zweifel am Erfolg des konditionellen Knockouts bestand. Der Leber-Phänotyp von $Ahr^{\Delta Cdh5}$ Mäusen mit geringerer Organmasse, erweiterter Vena portae und periportal Fibrose (Lommetz 2022) entsprach ferner wesentlich jenem bei komplettem Ahr-Knockout (Harstad et al. 2006; Corchero et al. 2004) oder konditionellem endotheliale Knockout mittels Cre unter dem Angiopoietin-1 Rezeptor- (Tek/Tie2) Promoter (Walisser et al. 2005) und es ist anzunehmen, dass die in dieser Arbeit genutzten $Ahr^{\Delta Cdh5}$ Mäuse analog ebenfalls einen persistierenden Ductus venosus aufwiesen. Übereinstimmend und vereinbar mit einem portosystemischen Shunt fiel bei transportalvenöser Leberperfusion im Vergleich zu Tieren mit

endothelialer Ahr-Expression konsistent ein verzögertes und peripher unvollständiges Verblassen des Organs auf (nicht abgebildet und nicht systematisch erfasst), ein angiographischer Nachweis wurde nicht durchgeführt.

Eine mögliche Erklärung wären zelluläre Verunreinigungen der in dieser Arbeit mittels in situ Kollagenase-Perfusion, Dichtegradientenzentrifugation und schließlich immunomagnetisch (MACS) anhand des Oberflächenmarkers CD146 separierten LSECs. Mit vergleichbaren Protokollen kann typischerweise eine circa 90-prozentige Reinheit mit Kontaminationen durch KCs und durch natürliche Killerzellen (NKC) erreicht werden (Guo et al. 2021; Liu et al. 2011). Vor dem Hintergrund der ineffizienteren und makroskopisch unvollständigen transportalvenösen Leberperfusion in Ahr^{ΔCdh5} Mäusen ist denkbar, dass LSEC-Kulturen aus diesen Tieren regelmäßig einen höheren Grad an Kontamination aufwiesen als Ahr^{fl/fl} LSEC-Kulturen. Differenzielle Wirkungen von Ahr-Liganden auf verunreinigende Zellen und LSECs könnten den Effekt eines Knockouts in letzteren überlagern. Tatsächlich ist CD146 ein Marker reifer NKCs (Despoix et al. 2008). NKCs kommen selbst als IL-6-Produzenten nur nachrangig infrage (Fauriat et al. 2010), allerdings augmentieren Ahr-Agonisten die Zytotoxizität von NKCs in vitro (Shin et al. 2013; Funseth und Ilbäck 1992), sodass eine nachgeschaltet gesteigerte IL-6-Sekretion durch Ahr^{ΔCdh5} LSECs denkbar ist. Die Reinheit isolierter LSECs und die Identität zellulärer Verunreinigungen kann durchflusszytometrisch oder immunhistochemisch geklärt beziehungsweise näher charakterisiert werden.

4.3. Der Ahr-Agonist ITE kann Leberentzündungen unterschiedlicher Genese aggravierend

Die Rolle des Ahr in entzündlichen Lebererkrankungen ist ambivalent. Während „klassische“ synthetische Agonisten mit hoher Affinität und Biopersistenz wie TCDD vermutlich primär hepatotoxisch sind, können primär nichttoxische dietätische oder mikrobielle Ahr-Liganden die Verläufe einzelner Modellerkrankungen günstig modifizieren (Patil et al. 2023; Carambia und Schuran 2021).

Der als nichttoxisch geltende und in verschiedenen Modellen autoimmuner Entzündungen erfolgreich therapeutisch angewandte Ahr-Agonist ITE (Gutiérrez-Vázquez und Quintana 2018) verstärkt jedoch die Hepatotoxizität von Paracetamol in Mäusen erheblich durch Induktion von CYP1A2 in Hepatozyten und konsekutive Akkumulation toxischer Metabolite (Schuran et al. 2021). Um die Beteiligung des Ahr in entzündlichen Lebererkrankungen weiter zu erfassen, wurden Modellerkrankungen in Mäusen an Ahr-defizienten Tieren angewandt oder die entsprechenden Tiere wurden mit ITE behandelt. In dieser Arbeit wurden drei Modelle genutzt: DDC-induzierte Cholestase, Mdr2-Knockout-induzierte toxische Cholangitis und CD8⁺ T-Zell-vermittelte Cholangitis im K14-OVAp-Modell. ITE hatte in keiner dieser Modellerkrankungen einen günstigen Effekt und teilweise zeigten sich Anhalte für eine nachteilige Wirkung.

Im K14-OVAp-Modell zeigten ITE-behandelte Tiere einen tendenziell ausgeprägteren Gewichtsverlust (Abbildung 24), signifikant stärker erhöhte Transaminasenaktivitäten im Sinne eines ausgeprägteren Leberschadens (Abbildung 25) und korrespondierend prädominant krankheitsursächliche OVAp-spezifische CD8⁺ T-Zellen sowie Monozyten im Leberinfiltrat (Abbildung 26 und Abbildung 28). Der Anteil der CD4⁺ T-Zellen an allen Lymphozyten war entsprechend deutlich verringert mit unverändertem Anteil der CD25⁺Foxp3⁺

Tregs (Abbildung 27). Im K14-OVAp-Modell spielen endogene CD4⁺ T-Zellen eine inflammatorische Rolle: Übereinstimmend mit der leberspezifischen Geschlechtsprädominanz weisen weibliche Tiere eine höhere Dichte von CD4⁺ T-Zellen und Th17-Zellen im Leberinfiltrat auf als männliche Tiere. Der Transfer von CD4⁺ T-Zellen aus Lebern erkrankter K14-OVAp Tiere in gesunde K14-OVAp Mäuse erzeugt ferner auch in Abwesenheit von OT-1 CD8⁺ T-Zellen eine Leberentzündung (Schwinge et al. 2015). Eine ITE-Behandlung hatte keinen Einfluss auf die Dichte der CD4⁺ T-Zellen in Lebern, in Milzen war diese erniedrigt (Abbildung 26). Künftig sollte eine weitere Differenzierung der rekrutierten T-Zell-Kompartimente erfolgen, etwa hinsichtlich Th17-Zellen, die zumindest bei der weiblichen Prädominanz des Modells eine Rolle spielen (Schwinge et al. 2015). Es ist ferner zu klären, inwieweit der aggravierte Verlauf in ITE-behandelten Tieren einer veränderten Interaktion zwischen OT-1 CD8⁺ T-Zellen und K14-OVAp Cholangiozyten entspricht: IL-17 aus OT-1 CD8⁺ T-Zellen induziert in K14-OVAp Cholangiozyten die Expression des PD-L1, welcher die Proliferation und Zytotoxizität der transferierten Zellen lindert (Stein et al. 2021). Interessanterweise werden hingegen in Tumorzellen durch Ahr-Aktivierung der PD-L1 und in Tumor-infiltrierenden CD8⁺ T-Zellen auch sein Rezeptor PD-1 im Sinne einer Immunevasion hochreguliert (Wang et al. 2019; Liu et al. 2018). Der Ahr ist ferner nur für die Entwicklung IL-17-sezernierender CD8⁺ T-Zellen unerlässlich, reguliert aber die Sekretion von IL-17 nicht wesentlich (Hayes et al. 2014).

In sechs Wochen alten Mdr2^{-/-} Mäusen war nach kurzfristiger (dreimalig binnen fünf Tagen) Behandlung mit ITE ein erhöhter Anteil CD11b⁺LY6G⁺ neutrophiler Granulozyten im Lebergewebe nachweisbar (Abbildung 19). Die Serum-Transaminasenaktivitäten und das histologische Bild blieben unverändert. Mdr2^{-/-} Mäuse zeigen typischerweise eine über Wochen dynamische Cholangitis und Fibrose. Das anfänglich CD11b⁺-reiche periduktale Infiltrat wird dabei in den ersten Lebenswochen durch ein CD4⁺ und CD8⁺ dominiertes Infiltrat ersetzt (Fickert et al. 2004). Vor diesem Hintergrund wäre von Interesse und immunhistologisch zu klären, wo sich die in dieser Arbeit durchflusszytometrisch in Lebern ITE-behandelten Tiere vermehrt nachgewiesenen CD11b⁺LY6G⁺ Zellen aufhalten. Ferner ist in Betracht zu ziehen, dass eine längerfristige ITE-Behandlung oder eine Behandlung in anderen Krankheitsphasen als der hier erfassten durchaus Einfluss auf weitere Endpunkte haben könnte.

Ergänzend wurde ein länger andauernder Versuch durchgeführt, in dem in weiblichen und männlichen Tieren zu jeweils drei Zeitpunkten (vier, acht, zwölf Lebenswochen) serologisch und histologisch geprüft werden sollte, ob konditionelle Ahr-Knockouts in Leberzellen (Hepatozyten, LSECs, DCs, KCs) einen Einfluss auf den Leberschaden in Mdr2^{-/-} Mäusen haben. Zusammenfassend zeigten sich – außer ausgeprägter portaler fibröser Expansion und septaler Fibrosierung in einzelnen acht Wochen alten Ahr^{ΔCdh5} Mdr2^{-/-} Tieren und einer erhöhten AST-Serumaktivität in vier Wochen alten Ahr^{ΔCdh5} Mdr2^{-/-} Tieren, vordringlich im Sinne eines additiven Effektes der beiden Knockouts – im Vergleich zu gleichgeschlechtlichen und gleichaltrigen Mdr2^{-/-} Ahr^{fl/fl} Tieren nach vier und acht Wochen keine relevanten Unterschiede. Vom ursprünglich angedachten Umfang des Versuches wurde daher abgesehen. Aus Tieren mit konditionellem Ahr-Knockout in KCs (Mdr2^{-/-} Ahr^{ΔLysM}) lagen bis zur Beendigung des Versuches keine ausreichenden Daten vor. Vorbehaltlich der verringerten Ligandenaffinität des Ahr in Ahr^{tm3.1Bra/J} Tieren und der davon abgeleiteten konditionellen

Knockout-Linien ergab sich kein Anhalt für eine Beteiligung des Ahr am Progress der Leberschädigung im Mdr2^{-/-} Modell.

In einem dieser Arbeit vorangehenden Versuch waren systemisch mit ITE behandelte Mäuse vor DDC-induziertem obstruktiv-cholestatischen Leberschaden geschützt. ITE-behandelte Tiere wiesen insbesondere auch keine pathognomonischen intraduktalen Porphyrin-Konkremente auf (unveröffentlicht), diese Beobachtung implizierte eine ausbleibende Porphyrin-Akkumulation. Daher kamen als Mechanismus vorrangig eine metabolische Interaktion mit Inaktivierung von DDC oder eine Modulation der DDC-gestörten Häm-Synthese (Maitra et al. 2019; Fickert et al. 2007) durch ITE infrage. Eine zusätzliche Wirkung auf die Zusammensetzung der Galle wäre denkbar, da Mäuse mit weniger toxischem Gallensäuren-Profil trotz Ausfällen von Porphyrin-Konkrementen keinen hepatozellulären Schaden aufweisen (Fuchs et al. 2017). DDC wird durch CYP3A-Enzyme inaktiviert (Hanada et al. 2010), deren Expression der Ahr allerdings, zumindest nach Aktivierung durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, negativ reguliert (Crosby und Riddick 2019; Lee und Riddick 2012). DDC verursacht durch Hemmung der Ferrochelatase (Methylierung von Häm zum Ferrochelatase-Inhibitor N-Methylprotoporphyrin) und Enthemmung der δ -Aminolävulinat-synthase (wegfallendes negatives Feedback von Häm) die Akkumulation von Porphyrinen (Maitra et al. 2019). TCDD verursacht in Mäusen ebenfalls eine gestörte Häm-Synthese durch Hemmung der Uroporphyrinogen-Decarboxylase mit Akkumulation von Uroporphyrinen, allerdings mit mehrwöchiger Latenz. Mäuse mit Ahr^d sind dafür weniger suszeptibel als jene mit Ahr^{b-1} (Davies et al. 2008). Eine TCDD-Behandlung verändert kurzfristig die Zusammensetzung der sezernierten Gallensäuren, erhöht unter anderem den tendenziell toxischeren hydrophoben Anteil (Csanaky et al. 2018) und aggraviert bei Tieren mit artifizierlicher obstruktiver Cholestase (Gallengang-Ligatur) den Verlauf (Ozeki et al. 2011).

Aufgrund des Wirkmechanismus von DDC kam für den zuvor beobachteten Schutz durch ITE vordringlich ein Ahr-vermittelter Effekt in Hepatozyten in Betracht. Diese Hypothese sollte geprüft werden, indem DDC-gefütterte Mäuse mit und ohne konditionellen Ahr-Knockout in Hepatozyten ITE- oder Vehikelbehandlungen unterzogen wurden. Alle Tiere wiesen unabhängig von Genotyp und ITE-Behandlung Porphyrin-Konkremente auf (Abbildung 11) und ITE hatte in beiden Genotypen keinen signifikanten Effekt auf den DDC-induzierten hepatozellulären Schaden (Abbildung 9) und keinen wesentlichen Effekt auf die Zusammensetzung des Leberinfiltrats (Abbildung 10 und Abbildung 12). Eine mögliche Erklärung für die nunmehr ausbleibende Wirkung von ITE wäre die geringere Ligandenaffinität von Ahr^d in konditionellen Knockout-Mäusen gegenüber Ahr^{b-1} in C57BL/6 im ursprünglichen Versuch. In einem erneuten Versuch zeigte ITE indes auch in C57BL/6 Mäusen keinen Effekt auf die Hepatotoxizität (Abbildung 14) oder auf die Porphyrin-Akkumulation.

Als methodisches Problem ist das Lösungsverhalten von ITE anzumerken. Stammlösungen wurden in dieser Arbeit mit DMSO oder mit Maisöl angesetzt, für in vitro Anwendungen in Zellkulturmedium und für i.p. Applikationen in PBS oder in Maisöl verdünnt. Bei Verdünnung in wässriger Lösung (Zellkulturmedium, PBS) auf Gebrauchskonzentrationen fielen regelmäßig feine Präzipitate aus. Dies betraf ITE von zwei verschiedenen Herstellern mit jeweils zertifizierter Reinheit $\geq 99\%$. ITE ist unlöslich in Wasser und in Datenblättern wird auf mögliche Präzipitation in wässrigen Lösungen, auch bei Verwendung von Trägerstoffen und Emulgatoren, hingewiesen. Teilweise werden Erwärmung, Sonifikation oder Vortex-

mischen der Suspension empfohlen (MedChemExpress). In der Primärliteratur wird der Sachverhalt nur vereinzelt benannt und gleichermaßen pragmatisch adressiert (Nugent et al. 2013). In dieser Arbeit wurde ITE ebenfalls durch längeres Vortexmischen fein suspendiert, bevor es in Zellkulturen verwendet oder (wenn PBS als Vehikel verwendet wurde) Mäusen intraperitoneal appliziert wurde. Tatsächlich liegen über die Löslichkeit, Absorption und Distribution von ITE in vivo bei parenteraler Gabe kaum Daten vor. Toxikologische Untersuchungen zeigen allerdings, dass insbesondere metabolisch stabile und potente Ahr-Agonisten toxische Wirkung haben, vergleichbar potente weniger persistente Agonisten jedoch nicht (Murray und Perdew 2020; Bradshaw und Bell 2009). Diese Beobachtungen legen nahe, dass der Absorption und Distribution von Ahr-Agonisten ebenfalls gewichtige Rollen zukommen könnten. In diesem Sinne sollte die Pharmakokinetik von ITE näher charakterisiert werden.

4.4. Fazit

Der Ahr ist ein Modulator immunologischer Toleranz auf unterschiedlichen zellulären Ebenen. Als therapeutische Zielstruktur ist er bei bestimmten Autoimmunerkrankungen bereits klinisch etabliert und bei weiteren in präklinischer und klinischer Erprobung. Diese Arbeit beschreibt erstmalig, dass auch die herausragende Fähigkeit von LSECs, in vitro Tregs zu induzieren, Ahr-abhängig ist. Zukünftig gilt es, mögliche Mechanismen und eine mögliche funktionelle Relevanz in vivo zu etablieren – auch vor dem Hintergrund eines etwaigen therapeutischen Potenzials.

Die Rolle des Ahr in Lebererkrankungen unterschiedlicher Ätiologie ist komplex, unvollständig erforscht und teilweise ambivalent. In Anknüpfung an vorangehende Untersuchungen zeigt diese Arbeit erstmals anhand weiterer Modelle entzündlicher Lebererkrankungen, dass sich eine systemische Ahr-Aktivierung mit einem als nichttoxisch geltenden Agonisten (ITE) nachteilig auswirken kann (ausgeprägter Leberschaden und vermehrte Infiltration CD8⁺ T-Zellen im K14-OVAp Modell) oder tendenziell nachteilige Subeffekte haben kann (Rekrutierung von Monozyten in Mdr2^{-/-} Mäusen). Zum einen ergeben sich aus diesen Beobachtungen wertvolle Implikationen für die Sicherheit perspektivischer Ahr-gerichteter Systemtherapien, zum anderen neue Fragen zur Rolle des Ahr in hepatotoxischen und hepatoprotektiven Mechanismen.

5. Zusammenfassung / Abstract

Zusammenfassung: Der Arylhydrocarbonrezeptor (Ahr) ist ein vielseitiger Immunmodulator und eine therapeutische Zielstruktur für die Induktion immunologischer Toleranz. Über seine Rolle in der hepatischen Immunregulation ist wenig bekannt. Diese Arbeit untersuchte, ob Toleranzmechanismen in Endothelzellen der Leber (LSECs) ebenfalls Ahr-abhängig sind und ob der Ahr die Verläufe entzündlicher Lebererkrankungen beeinflusst.

Ahr-defiziente LSECs zeigten in vitro eine erheblich beeinträchtigte Fähigkeit, regulatorische T-Zellen (Tregs) zu induzieren. In Mausmodellen entzündlicher Lebererkrankungen (Mdr2-Knockout, DDC-Fütterung, K14-OVAp) ergaben sich keine Hinweise für eine protektive Rolle des Ahr. Der als nichttoxisch geltende Agonist ITE aggravierte hingegen den Leberschaden im K14-OVAp Modell, vermutlich aufgrund einer gesteigerten Rekrutierung oder Proliferation reaktiver CD8⁺ T-Zellen in der Leber, und führte zu einer vermehrten Infiltration von Neutrophilen im Mdr2-Knockout-Modell.

Diese Arbeit etabliert erstmalig eine Rolle für den Ahr in LSECs bei der Induktion von Tregs. Im Kontext entzündlicher Lebererkrankungen sind Ahr-Agonisten möglicherweise schädlich.

/

Abstract: The aryl hydrocarbon receptor (Ahr) is a versatile modulator of immune responses and a therapeutic target in autoimmune diseases. However, its role in hepatic immune homeostasis remains largely unknown. This thesis investigates the Ahr's contribution to tolerogenic mechanisms in liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) and its impact on inflammatory liver diseases.

Ahr deficiency severely compromised LSECs' ability to induce regulatory T cells (Tregs) in vitro. In mouse models of cholangitis (Mdr2 knockout, DDC feeding, K14-OVAp), no evidence of protective effects exerted by the Ahr was observed. Conversely, treatment with the non-toxic Ahr agonist ITE exacerbated liver damage and enhanced CD8⁺ T cell proliferation or infiltration in livers of K14-OVap mice. In Mdr2 knockout mice, neutrophil liver infiltration was increased by ITE treatment.

These results reveal Ahr as a key player in LSEC-mediated Treg induction. In the context of inflammatory liver disease, Ahr agonists might pose a risk.

6. Abkürzungsverzeichnis

In dieser Arbeit wurden Einheiten und Präfixe des Internationalen Einheitensystems (SI) und Elementsymbole nach der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) verwendet, diese sind im Abkürzungsverzeichnis nicht aufgeführt. Die Pluralformen der verwendeten Abkürzungen enden auf s.

<i>Abkürzung</i>	<i>Bedeutung</i>
Ahr	Arylhydrocarbonrezeptor
Alb	Albumin
ALT	Alanin-Aminotransferase
APC	Antigen-präsentierende Zelle (Antigen presenting cell)
ARNT	Ahr-Kerntranslokator (Ahr nuclear translocator)
AST	Aspartat-Aminotransferase
BMDC	Dendritische Zelle aus dem Knochenmark (Bone marrow-derived dendritic cell)
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
cDC	Konventionelle dendritische Zelle (Conventional dendritic cell)
Cdh5	Cadherin 5
CYP	Cytochrom P450
DC	Dendritische Zelle (Dendritic cell)
DDC	3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (Enzyme-linked immunosorbent assay)
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (Fluorescence-activated cell sorting)
Fc	Kristallisierbares Antikörperfragment (Fragment crystallizable)
FCS	Fetales Kälberserum (Fetal calf serum)
FFPE	Formalin-fixiert und Paraffin-eingebettet (Formalin-fixed paraffin-embedded)
FICZ	5,11-Dihydroindolo[3,2- <i>b</i>]carbazol-6-carbaldehyd
fl	Kennzeichnet Gene, die von loxP, der Erkennungsstelle der Cre-Rekombinase, flankiert sind (Floxed)
Foxp3	Forkhead box Protein 3
<i>g</i>	Mittlere Erdschwerebeschleunigung (Standard gravity). Kursivdruck zur Unterscheidung von der SI-Einheit g für Gramm
GBSS	Balancierte Salzlösung nach Gey (Gey's balanced salt solution)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HSC	Hepatische Sternzelle (Hepatic stellate cell)
i.p.	Intraperitoneal
IDO	Indolamin 2,3-Deoxygenase
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IMDM	Modifiziertes Dulbecco's Medium nach Iscove (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)
ITE	2-(1'-H-Indol-3'-carbonyl)-thiazol-4-carboxylsäuremethylester
Itgax	Integrin α -X

<i>Abkürzung</i>	<i>Bedeutung</i>
IUPAC	Internationale Union für reine und angewandte Chemie (International Union of Pure and Applied Chemistry)
KC	Kupffer-Zelle (Kupffer cell)
L-Kyn	L-Kynurenin
LPS	Lipopolysaccharid
LSEC	Endothelzelle der Lebersinusoiden (Liver sinusoidal endothelial cell)
LysM	Lysozym M
MACS	Magnetische Zellseparation (Magnetic activated cell sorting)
Mdr2	Multi drug resistance gene 2
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major histocompatibility complex)
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
NKC	Natürliche Killerzelle (Natural killer cell)
NPC	Nicht-parenchymale Zelle (Non-parenchymal cell)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline)
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed death-ligand 1
pDC	Plasmazytoide dendritische Zelle (Plasmacytoid dendritic cell)
Pen/Strep	Penicillin und Streptomycin
s.c.	Subkutan (Sub cutis)
SI	Internationales Einheitensystem (Système international d'unités)
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin
TGF	Transforming growth factor
Th-Zelle	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor
Treg	Regulatorische T-Zelle
U	Enzymeinheit (Unit)
XRE	Xenobiotic response element

Tabelle 13: Abkürzungen.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mikrozirkulation in der Leber.	2
Abbildung 2: Genomischer Signalweg des Arylhydrocarbonrezeptors.	6
Abbildung 3: Exemplarisches Gating bei Fluoreszenz-aktivierter Durchflusszytometrie.	27
Abbildung 4: LSECs ohne und mit Ahr-Knockout in Zellkultur.	29
Abbildung 5: LPS-induzierte IL-6-Antworten in LSECs ohne und mit Ahr-Knockout bei simultaner Behandlung mit Ahr-Agonisten.	31
Abbildung 6: LPS-induzierte IL-6-Antworten in LSECs ohne und mit Ahr-Knockout bei simultaner Behandlung mit dem Ahr-Antagonisten CH223191.	32
Abbildung 7: Modulation LPS-induzierter IL-6-Antworten durch CH223191 und ITE in LSECs aus B6.SJL Mäusen.	32
Abbildung 8: Ahr-abhängige Treg-Konversion durch LSECs, Leber-DCs und Milz-DCs in vitro.	33
Abbildung 9: DDC-induzierte Leberschädigung bei konditionellem Ahr-Knockout in Hepatozyten und Behandlung mit dem Ahr-Agonisten ITE.	35
Abbildung 10: Entzündliches Infiltrat in Lebern von Mäusen mit DDC-induzierter Leberschädigung bei konditionellem Ahr-Knockout in Hepatozyten und Behandlung mit dem Ahr-Agonisten ITE.	35
Abbildung 11: Leberhistologie von Mäusen mit DDC-induzierter obstruktiver Cholangiopathie bei konditionellem Ahr-Knockout in Leberzellen und Behandlung mit dem Ahr-Agonisten ITE.	36
Abbildung 12: Durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Populationen in Leber und Milz von Mäusen mit DDC-induzierter Leberschädigung bei konditionellem Ahr-Knockout in Hepatozyten und Behandlung mit dem Ahr-Agonisten ITE.	37
Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analyse der Neutrophilen und Monozyten in Leber und Milz von Mäusen mit DDC-induzierter Leberschädigung bei konditionellem Ahr-Knockout in Hepatozyten und Behandlung mit dem Ahr-Agonisten ITE.	38
Abbildung 14: Serum-Transaminasenaktivitäten bei DDC-induzierter Leberschädigung und Behandlung mit dem Ahr-Agonisten ITE in C57BL/6J Mäusen.	39
Abbildung 15: Entzündliches Infiltrat in Lebern von C57BL/6J Mäusen mit DDC-induzierter Leberschädigung und Behandlung mit dem Ahr-Agonisten ITE.	39
Abbildung 16: Durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Populationen in Leber und Milz ITE-behandelter C57BL/6J Mäuse bei DDC-induzierter Leberschädigung.	40
Abbildung 17: Durchflusszytometrische Analyse der Neutrophilen und Monozyten in Leber und Milz ITE-behandelter C57BL/6J Mäuse bei DDC-induzierter Leberschädigung.	41
Abbildung 18: Serum-Transaminasenaktivitäten bei ITE-behandelten Mdr2 ^{-/-} Mäusen.	42
Abbildung 19: Durchflusszytometrische Analyse der Monozyten und Neutrophilen in Leber und Milz ITE-behandelter Mdr2 ^{-/-} Mäuse.	42
Abbildung 20: Durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Populationen in Leber und Milz ITE-behandelter Mdr2 ^{-/-} Mäuse.	43

Abbildung 21: Histologische Veränderungen bei Mdr2 ^{-/-} Mäusen mit konditionellen Ahr-Knockouts in Leberzellen (Übersichtsaufnahmen).	45
Abbildung 22: Histologische Veränderungen bei Mdr2 ^{-/-} Mäusen mit konditionellen Ahr-Knockouts in Leberzellen (Portalfelder).	46
Abbildung 23: Serum-Transaminasenaktivitäten bei Mdr2 ^{-/-} Mäusen mit konditionellen Ahr-Knockouts in Leberzellen.	48
Abbildung 24: Gewichtsverläufe bei CD8 ⁺ T-Zell-vermittelter Cholangitis (K14-OVAp) und Behandlung mit dem Ahr-Agonisten ITE.	49
Abbildung 25: Serum-Transaminasenaktivitäten bei CD8 ⁺ T-Zell-vermittelter Cholangitis (K14-OVAp) und Behandlung mit dem Ahr-Agonisten ITE.	50
Abbildung 26: Durchflusszytometrisch bestimmte Anteile der OT-1 CD8 ⁺ T-Zellen und Dichte endogener CD4 ⁺ T-Zellen in Leber und Milz ITE-behandelter Tiere im K14-OVAp Modell.	51
Abbildung 27: Durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Populationen in Leber und Milz ITE-behandelter Mäuse mit CD8 ⁺ T-Zell-vermittelter Cholangitis (K14-OVAp).	52
Abbildung 28: Durchflusszytometrische Analyse der Monozyten und Neutrophilen in Leber und Milz ITE-behandelter Mäuse mit CD8 ⁺ T-Zell-vermittelter Cholangitis (K14-OVAp).	53
Abbildung 29: Körper- und Lebergewichte bei Mdr2 ^{-/-} Mäusen mit konditionellen Ahr-Knockouts in Leberzellen.	82

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.	13
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien.	14
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.	15
Tabelle 4: Verwendete Pufferlösungen.	15
Tabelle 5: Für die magnetische Zellseparation verwendete anti-Maus Antikörper.	16
Tabelle 6: Für Durchflusszytometrien verwendete Fluorochrom-gekoppelte anti-Maus Antikörper.	16
Tabelle 7: Verwendete Kits.	16
Tabelle 8: Verwendete Software.	17
Tabelle 9: Für die Erzeugung konditioneller Ahr-Knockouts verwendete Mauslinien.	18
Tabelle 10: Verwendete Mauslinien mit konditionellen Ahr-Knockouts in Leberzellen.	19
Tabelle 11: Verwendete Mauslinien mit Mdr2-Knockout und konditionellen Ahr-Knockouts in Leberzellen.	19
Tabelle 12: Verwendete Mauslinien ohne konditionelle Ahr-Knockouts.	20
Tabelle 13: Abkürzungen.	63
Tabelle 14: Gruppenverteilung bei Mdr2 ^{-/-} mit konditionellen Ahr-Knockouts in Leberzellen.	81

9. Literaturverzeichnis

- Akbarpour, Mahzad; Goudy, Kevin S.; Cantore, Alessio; Russo, Fabio; Sanvito, Francesca; Naldini, Luigi et al. (2015): Insulin B chain 9-23 gene transfer to hepatocytes protects from type 1 diabetes by inducing Ag-specific FoxP3⁺ Tregs. In: *Science translational medicine* 7 (289), 289ra81. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaa3032.
- Andreola, Fausto; Calvisi, Diego F.; Elizondo, Guillermo; Jakowlew, Sonia B.; Mariano, Jennifer; Gonzalez, Frank J.; Luca, Luigi M. de (2004): Reversal of liver fibrosis in aryl hydrocarbon receptor null mice by dietary vitamin A depletion. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 39 (1), S. 157–166. DOI: 10.1002/hep.20004.
- Avilla, Mele N.; Malecki, Kristen M. C.; Hahn, Mark E.; Wilson, Rachel H.; Bradfield, Christopher A. (2020): The Ah Receptor: Adaptive Metabolism, Ligand Diversity, and the Xenokine Model. In: *Chemical research in toxicology* 33 (4), S. 860–879. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.9b00476.
- Bamboate, Zubin M.; Stableford, Jennifer A.; Plitas, George; Burt, Bryan M.; Nguyen, Hoang M.; Welles, Alexander P. et al. (2009): Human liver dendritic cells promote T cell hyporesponsiveness. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182 (4), S. 1901–1911. DOI: 10.4049/jimmunol.0803404.
- Bankoti, Jaishree; Rase, Ben; Simones, Tom; Shepherd, David M. (2010): Functional and phenotypic effects of AhR activation in inflammatory dendritic cells. In: *Toxicology and applied pharmacology* 246 (1-2), S. 18–28. DOI: 10.1016/j.taap.2010.03.013.
- Barroso, Andreia; Mahler, João V.; Fonseca-Castro, Pedro H.; Quintana, Francisco J. (2021): Therapeutic induction of tolerogenic dendritic cells via aryl hydrocarbon receptor signaling. In: *Current opinion in immunology* 70, S. 33–39. DOI: 10.1016/j.coi.2021.02.003.
- Bessede, Alban; Gargaro, Marco; Pallotta, Maria T.; Matino, Davide; Servillo, Giuseppe; Brunacci, Cinzia et al. (2014): Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defence pathway. In: *Nature* 511 (7508), S. 184–190. DOI: 10.1038/nature13323.
- Bhandari, Sabin; Larsen, Anett Kristin; McCourt, Peter; Smedsrød, Bård; Sørensen, Karen Kristine (2021): The Scavenger Function of Liver Sinusoidal Endothelial Cells in Health and Disease. In: *Frontiers in physiology* 12, S. 757469. DOI: 10.3389/fphys.2021.757469.
- Bissonnette, R.; Saint-Cyr Proulx, E.; Jack, C.; Maari, C. (2023): Tapinarof for psoriasis and atopic dermatitis: 15 years of clinical research. In: *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* 37 (6), S. 1168–1174. DOI: 10.1111/jdv.18925.
- Bissonnette, Robert; Stein Gold, Linda; Rubenstein, David S.; Tallman, Anna M.; Armstrong, April (2021): Tapinarof in the treatment of psoriasis: A review of the unique mechanism of action of a novel therapeutic aryl hydrocarbon receptor-modulating agent. In: *Journal of the American Academy of Dermatology* 84 (4), S. 1059–1067. DOI: 10.1016/j.jaad.2020.10.085.
- Bode, Johannes G.; Albrecht, Ute; Häussinger, Dieter; Heinrich, Peter C.; Schaper, Fred (2012): Hepatic acute phase proteins--regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF-κB-dependent signaling. In: *European journal of cell biology* 91 (6-7), S. 496–505. DOI: 10.1016/j.ejcb.2011.09.008.
- Bradshaw, Tracey D.; Bell, David R. (2009): Relevance of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) for clinical toxicology. In: *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)* 47 (7), S. 632–642. DOI: 10.1080/15563650903140423.

- Breiner, K. M.; Schaller, H.; Knolle, P. A. (2001): Endothelial cell-mediated uptake of a hepatitis B virus: a new concept of liver targeting of hepatotropic microorganisms. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 34 (4 Pt 1), S. 803–808. DOI: 10.1053/jhep.2001.27810.
- Burghardt, Sven; Claass, Benjamin; Erhardt, Annette; Karimi, Khalil; Tiegs, Gisa (2014): Hepatocytes induce Foxp3⁺ regulatory T cells by Notch signaling. In: *Journal of leukocyte biology* 96 (4), S. 571–577. DOI: 10.1189/jlb.2AB0613-342RR.
- Cabeza-Cabrerizo, Mar; Cardoso, Ana; Minutti, Carlos M.; Da Pereira Costa, Mariana; Reis e Sousa, Caetano (2021): Dendritic Cells Revisited. In: *Annual review of immunology* 39, S. 131–166. DOI: 10.1146/annurev-immunol-061020-053707.
- Carambia, Antonella; Frenzel, Christian; Bruns, Oliver T.; Schwinge, Dorothee; Reimer, Rudolph; Hohenberg, Heinrich et al. (2013): Inhibition of inflammatory CD4 T cell activity by murine liver sinusoidal endothelial cells. In: *Journal of hepatology* 58 (1), S. 112–118. DOI: 10.1016/j.jhep.2012.09.008.
- Carambia, Antonella; Freund, Barbara; Schwinge, Dorothee; Bruns, Oliver T.; Salmen, Sunhild C.; Ittrich, Harald et al. (2015): Nanoparticle-based autoantigen delivery to Treg-inducing liver sinusoidal endothelial cells enables control of autoimmunity in mice. In: *Journal of hepatology* 62 (6), S. 1349–1356. DOI: 10.1016/j.jhep.2015.01.006.
- Carambia, Antonella; Freund, Barbara; Schwinge, Dorothee; Heine, Markus; Laschtowitz, Alena; Huber, Samuel et al. (2014): TGF-beta-dependent induction of CD4(+)CD25(+) Foxp3(+) Tregs by liver sinusoidal endothelial cells. In: *Journal of hepatology* 61 (3), S. 594–599. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.04.027.
- Carambia, Antonella; Gottwick, Cornelia; Schwinge, Dorothee; Stein, Stephanie; Digigow, Reinaldo; Şeleci, Muharrem et al. (2021): Nanoparticle-mediated targeting of autoantigen peptide to cross-presenting liver sinusoidal endothelial cells protects from CD8 T-cell-driven autoimmune cholangitis. In: *Immunology* 162 (4), S. 452–463. DOI: 10.1111/imm.13298.
- Carambia, Antonella; Schuran, Fenja Amrei (2021): The aryl hydrocarbon receptor in liver inflammation. In: *Seminars in immunopathology* 43 (4), S. 563–575. DOI: 10.1007/s00281-021-00867-8.
- Cervantes-Barragan, Luisa; Lewis, Kanako L.; Firner, Sonja; Thiel, Volker; Hugues, Stephanie; Reith, Walter et al. (2012): Plasmacytoid dendritic cells control T-cell response to chronic viral infection. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (8), S. 3012–3017. DOI: 10.1073/pnas.1117359109.
- Choi, Eun-Young; Lee, Hyosung; Dingle, R. W. Cameron; Kim, Kyung Bo; Swanson, Hollie I. (2012): Development of novel CH223191-based antagonists of the aryl hydrocarbon receptor. In: *Molecular pharmacology* 81 (1), S. 3–11. DOI: 10.1124/mol.111.073643.
- Corchero, Javier; Martín-Partido, Gervasio; Dallas, Sarah L.; Fernández-Salguero, Pedro M. (2004): Liver portal fibrosis in dioxin receptor-null mice that overexpress the latent transforming growth factor-beta-binding protein-1. In: *International journal of experimental pathology* 85 (5), S. 295–302. DOI: 10.1111/j.0959-9673.2004.00397.x.
- Crispe, Ian Nicholas (2011): Liver antigen-presenting cells. In: *Journal of hepatology* 54 (2), S. 357–365. DOI: 10.1016/j.jhep.2010.10.005.

- Crosby, Michael; Riddick, David S. (2019): Suppression of Hepatic CYP3A4 Expression and Activity by 3-Methylcholanthrene in Humanized PXR-CAR-CYP3A4/3A7 Mice. In: *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 47 (3), S. 279–282. DOI: 10.1124/dmd.118.084509.
- Csanaky, Iván L.; Lickteig, Andrew J.; Klaassen, Curtis D. (2018): Aryl hydrocarbon receptor (AhR) mediated short-term effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on bile acid homeostasis in mice. In: *Toxicology and applied pharmacology* 343, S. 48–61. DOI: 10.1016/j.taap.2018.02.005.
- Davies, Reginald; Clothier, Bruce; Robinson, Susan W.; Edwards, Richard E.; Greaves, Peter; Luo, Jinli et al. (2008): Essential role of the AH receptor in the dysfunction of heme metabolism induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. In: *Chemical research in toxicology* 21 (2), S. 330–340. DOI: 10.1021/tx700176r.
- Denison, Michael S.; Nagy, Scott R. (2003): Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 43, S. 309–334. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135828.
- Despoix, Nicolas; Walzer, Thierry; Jouve, Nathalie; Blot-Chabaud, Marcel; Bardin, Nathalie; Paul, Pascale et al. (2008): Mouse CD146/MCAM is a marker of natural killer cell maturation. In: *European journal of immunology* 38 (10), S. 2855–2864. DOI: 10.1002/eji.200838469.
- Diehl, Linda; Schurich, Anna; Grochtmann, Regina; Hegenbarth, Silke; Chen, Lieping; Knolle, Percy A. (2008): Tolerogenic maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7-homolog 1-dependent CD8⁺ T cell tolerance. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 47 (1), S. 296–305. DOI: 10.1002/hep.21965.
- Dong, Fangcong; Perdew, Gary H. (2020): The aryl hydrocarbon receptor as a mediator of host-microbiota interplay. In: *Gut microbes* 12 (1), S. 1859812. DOI: 10.1080/19490976.2020.1859812.
- Dou, Lei; Ono, Yoshihiro; Chen, Yi-Fa; Thomson, Angus W.; Chen, Xiao-Ping (2018): Hepatic Dendritic Cells, the Tolerogenic Liver Environment, and Liver Disease. In: *Seminars in liver disease* 38 (2), S. 170–180. DOI: 10.1055/s-0038-1646949.
- Duarte, João H.; Di Meglio, Paola; Hirota, Keiji; Ahlfors, Helena; Stockinger, Brigitta (2013): Differential influences of the aryl hydrocarbon receptor on Th17 mediated responses in vitro and in vivo. In: *PloS one* 8 (11), e79819. DOI: 10.1371/journal.pone.0079819.
- Dumbrava, Ecaterina Elena; Cecchini, Michael; Zugazagoitia, Jon; Lopez, Juanita Suzanne; Jäger, Dirk; Oliva, Marc et al. (2023): Initial results from a first-in-human, phase I study of immunomodulatory aryl hydrocarbon receptor (AhR) inhibitor BAY2416964 in patients with advanced solid tumors. In: *JCO* 41 (16_suppl), S. 2502. DOI: 10.1200/JCO.2023.41.16_suppl.2502.
- Ellett, Justin D.; Atkinson, Carl; Evans, Zachary P.; Amani, Zainab; Balish, Edward; Schmidt, Michael G. et al. (2010): Murine Kupffer cells are protective in total hepatic ischemia/reperfusion injury with bowel congestion through IL-10. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184 (10), S. 5849–5858. DOI: 10.4049/jimmunol.0902024.

- Emmanuilidis, K.; Weighardt, H.; Maier, S.; Gerauer, K.; Fleischmann, T.; Zheng, X. X. et al. (2001): Critical role of Kupffer cell-derived IL-10 for host defense in septic peritonitis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 167 (7), S. 3919–3927. DOI: 10.4049/jimmunol.167.7.3919.
- Fauriat, Cyril; Long, Eric O.; Ljunggren, Hans-Gustaf; Bryceson, Yenan T. (2010): Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. In: *Blood* 115 (11), S. 2167–2176. DOI: 10.1182/blood-2009-08-238469.
- Fernández-Gallego, Nieves; Sánchez-Madrid, Francisco; Cibrian, Danay (2021): Role of AHR Ligands in Skin Homeostasis and Cutaneous Inflammation. In: *Cells* 10 (11). DOI: 10.3390/cells10113176.
- Fickert, Peter; Fuchsbichler, Andrea; Wagner, Martin; Zollner, Gernot; Kaser, Arthur; Tilg, Herbert et al. (2004): Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. In: *Gastroenterology* 127 (1), S. 261–274. DOI: 10.1053/j.gastro.2004.04.009.
- Fickert, Peter; Pollheimer, Marion J.; Beuers, Ulrich; Lackner, Carolin; Hirschfield, Gideon; Housset, Chantal et al. (2014): Characterization of animal models for primary sclerosing cholangitis (PSC). In: *Journal of hepatology* 60 (6), S. 1290–1303. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.02.006.
- Fickert, Peter; Stoger, Ulrike; Fuchsbichler, Andrea; Moustafa, Tarek; Marschall, Hanns-Ulrich; Weiglein, Andreas H. et al. (2007): A new xenobiotic-induced mouse model of sclerosing cholangitis and biliary fibrosis. In: *The American journal of pathology* 171 (2), S. 525–536. DOI: 10.2353/ajpath.2007.061133.
- Freitas-Lopes, Maria Alice; Mafra, Kassiana; David, Bruna A.; Carvalho-Gontijo, Raquel; Menezes, Gustavo B. (2017): Differential Location and Distribution of Hepatic Immune Cells. In: *Cells* 6 (4). DOI: 10.3390/cells6040048.
- Fuchs, Claudia D.; Paumgartner, Gustav; Wahlström, Annika; Schwabl, Philipp; Reiberger, Thomas; Leditznig, Nadja et al. (2017): Metabolic preconditioning protects BSEP/ABCB11-/- mice against cholestatic liver injury. In: *Journal of hepatology* 66 (1), S. 95–101. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.08.017.
- Fujii-Kuriyama, Y.; Mimura, J. (2005): Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. In: *Biochemical and biophysical research communications* 338 (1), S. 311–317. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.08.162.
- Funseth, E.; Ilbäck, N. G. (1992): Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on blood and spleen natural killer (NK) cell activity in the mouse. In: *Toxicology letters* 60 (3), S. 247–256. DOI: 10.1016/0378-4274(92)90282-O.
- Gagliani, Nicola; Amezcua Vesely, Maria Carolina; Iseppon, Andrea; Brockmann, Leonie; Xu, Hao; Palm, Noah W. et al. (2015): Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. In: *Nature* 523 (7559), S. 221–225. DOI: 10.1038/nature14452.
- Ganesan, Latha P.; Mohanty, Sudhasri; Kim, Jonghan; Clark, K. Reed; Robinson, John M.; Anderson, Clark L. (2011): Rapid and efficient clearance of blood-borne virus by liver sinusoidal endothelium. In: *PLoS pathogens* 7 (9), e1002281. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002281.

- Goswami, Tapas Kumar; Singh, Mithilesh; Dhawan, Manish; Mitra, Saikat; Emran, Talha Bin; Rabaan, Ali A. et al. (2022): Regulatory T cells (Tregs) and their therapeutic potential against autoimmune disorders - Advances and challenges. In: *Human vaccines & immunotherapeutics* 18 (1), S. 2035117. DOI: 10.1080/21645515.2022.2035117.
- Goubier, Anne; Dubois, Bertrand; Gheit, Hanane; Joubert, Grégoire; Villard-Truc, Florence; Asselin-Paturel, Carine et al. (2008): Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. In: *Immunity* 29 (3), S. 464–475. DOI: 10.1016/j.immuni.2008.06.017.
- Guidotti, Luca G.; Inverso, Donato; Sironi, Laura; Di Lucia, Pietro; Fioravanti, Jessica; Ganzer, Lucia et al. (2015): Immunosurveillance of the liver by intravascular effector CD8(+) T cells. In: *Cell* 161 (3), S. 486–500. DOI: 10.1016/j.cell.2015.03.005.
- Guo, Qianqian; Furuta, Kunimaro; Aly, Ahmed; Ibrahim, Samar H. (2021): Isolation and Characterization of Mouse Primary Liver Sinusoidal Endothelial Cells. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (178). DOI: 10.3791/63062.
- Gutiérrez-Vázquez, Cristina; Quintana, Francisco J. (2018): Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. In: *Immunity* 48 (1), S. 19–33. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.12.012.
- Hahn, Mark E. (2002): Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. In: *Chemico-biological interactions* 141 (1-2), S. 131–160. DOI: 10.1016/s0009-2797(02)00070-4.
- Hanada, Shinichiro; Snider, Natasha T.; Brunt, Elizabeth M.; Hollenberg, Paul F.; Omary, M. Bishr (2010): Gender dimorphic formation of mouse Mallory-Denk bodies and the role of xenobiotic metabolism and oxidative stress. In: *Gastroenterology* 138 (4), S. 1607–1617. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.12.055.
- Harden, Jamie L.; Egilmez, Nejat K. (2012): Indoleamine 2,3-dioxygenase and dendritic cell tolerogenicity. In: *Immunological investigations* 41 (6-7), S. 738–764. DOI: 10.3109/08820139.2012.676122.
- Harstad, Eric B.; Guite, Christopher A.; Thomae, Tami L.; Bradfield, Christopher A. (2006): Liver deformation in Ahr-null mice: evidence for aberrant hepatic perfusion in early development. In: *Molecular pharmacology* 69 (5), S. 1534–1541. DOI: 10.1124/mol.105.020107.
- Hauben, Ehud; Gregori, Silvia; Draghici, Elena; Migliavacca, Barbara; Olivieri, Stefano; Woisetschlager, Maximilian; Roncarolo, Maria Grazia (2008): Activation of the aryl hydrocarbon receptor promotes allograft-specific tolerance through direct and dendritic cell-mediated effects on regulatory T cells. In: *Blood* 112 (4), S. 1214–1222. DOI: 10.1182/blood-2007-08-109843.
- Hayes, Mark D.; Ovcinnikovs, Vitalijs; Smith, Andrew G.; Kimber, Ian; Dearman, Rebecca J. (2014): The aryl hydrocarbon receptor: differential contribution to T helper 17 and T cytotoxic 17 cell development. In: *PloS one* 9 (9), e106955. DOI: 10.1371/journal.pone.0106955.
- Herkel, Johannes; Jagemann, Bettina; Wiegand, Christiane; Lazaro, Jose Francisco Garcia; Lueth, Stefan; Kanzler, Stephan et al. (2003): MHC class II-expressing hepatocytes function as antigen-presenting cells and activate specific CD4 T lymphocytes. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 37 (5), S. 1079–1085. DOI: 10.1053/jhep.2003.50191.
- Hogquist, K. A.; Jameson, S. C.; Heath, W. R.; Howard, J. L.; Bevan, M. J.; Carbone, F. R. (1994): T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. In: *Cell* 76 (1), S. 17–27. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90169-4.

- Holz, Lauren E.; Warren, Alessandra; Le Couteur, David G.; Bowen, David G.; Bertolino, Patrick (2010): CD8⁺ T cell tolerance following antigen recognition on hepatocytes. In: *Journal of autoimmunity* 34 (1), S. 15–22. DOI: 10.1016/j.jaut.2009.08.005.
- Horst, Andrea Kristina; Neumann, Katrin; Diehl, Linda; Tiegs, Gisa (2016): Modulation of liver tolerance by conventional and nonconventional antigen-presenting cells and regulatory immune cells. In: *Cellular & molecular immunology* 13 (3), S. 277–292. DOI: 10.1038/cmi.2015.112.
- Huang, Wei; Rui, Ke; Wang, Xiaomeng; Peng, Na; Zhou, Wenhao; Shi, Xiaofei et al. (2023): The aryl hydrocarbon receptor in immune regulation and autoimmune pathogenesis. In: *Journal of autoimmunity* 138, S. 103049. DOI: 10.1016/j.jaut.2023.103049.
- Jemail, Leila; Miyao, Masashi; Kotani, Hirokazu; Kawai, Chihiro; Minami, Hirozo; Abiru, Hitoshi; Tamaki, Keiji (2018): Pivotal roles of Kupffer cells in the progression and regression of DDC-induced chronic cholangiopathy. In: *Scientific reports* 8 (1), S. 6415. DOI: 10.1038/s41598-018-24825-x.
- Jurado-Manzano, Brenda B.; Zavala-Reyes, Daniel; Turrubiarres-Martínez, Edgar A.; Portales-Pérez, Diana P.; González-Amaro, Roberto; Layseca-Espinosa, Esther (2017): FICZ generates human tDCs that induce CD4(+) CD25(high) Foxp3(+) Treg-like cell differentiation. In: *Immunology letters* 190, S. 84–92. DOI: 10.1016/j.imlet.2017.07.013.
- Kamm, Dakota R.; McCommis, Kyle S. (2022): Hepatic stellate cells in physiology and pathology. In: *The Journal of physiology* 600 (8), S. 1825–1837. DOI: 10.1113/JP281061.
- Katzenellenbogen, Mark; Mizrahi, Lina; Pappo, Orit; Klopstock, Naama; Olam, Devorah; Jacob-Hirsch, Jasmine et al. (2007): Molecular mechanisms of liver carcinogenesis in the *mdr2*-knockout mice. In: *Molecular cancer research : MCR* 5 (11), S. 1159–1170. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-07-0172.
- Katzenellenbogen, Mark; Pappo, Orit; Barash, Hila; Klopstock, Naama; Mizrahi, Lina; Olam, Devorah et al. (2006): Multiple adaptive mechanisms to chronic liver disease revealed at early stages of liver carcinogenesis in the *Mdr2*-knockout mice. In: *Cancer research* 66 (8), S. 4001–4010. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2937.
- Kenison, Jessica E.; Jhaveri, Aditi; Li, Zhaorong; Khadse, Nikita; Tjon, Emily; Tezza, Sara et al. (2020): Tolerogenic nanoparticles suppress central nervous system inflammation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (50), S. 32017–32028. DOI: 10.1073/pnas.2016451117.
- Kern, Michaela; Popov, Alexey; Scholz, Kai; Schumak, Beatrix; Djandji, Dominik; Limmer, Andreas et al. (2010): Virally infected mouse liver endothelial cells trigger CD8⁺ T-cell immunity. In: *Gastroenterology* 138 (1), S. 336–346. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.08.057.
- Kim, Sun-Hee; Henry, Ellen C.; Kim, Dong-Kyu; Kim, Yun-Hee; Shin, Kum Joo; Han, Myoung Sook et al. (2006): Novel compound 2-methyl-2H-pyrazole-3-carboxylic acid (2-methyl-4-o-tolylazo-phenyl)-amide (CH-223191) prevents 2,3,7,8-TCDD-induced toxicity by antagonizing the aryl hydrocarbon receptor. In: *Molecular pharmacology* 69 (6), S. 1871–1878. DOI: 10.1124/mol.105.021832.
- Kimura, Akihiro; Naka, Tetsuji; Nakahama, Taisuke; Chinen, Ichino; Masuda, Kazuya; Nohara, Keiko et al. (2009): Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses. In: *The Journal of experimental medicine* 206 (9), S. 2027–2035. DOI: 10.1084/jem.20090560.

- Kinoshita, Manabu; Uchida, Takefumi; Sato, Atsushi; Nakashima, Masahiro; Nakashima, Hiroyuki; Shono, Satoshi et al. (2010): Characterization of two F4/80-positive Kupffer cell subsets by their function and phenotype in mice. In: *Journal of hepatology* 53 (5), S. 903–910. DOI: 10.1016/j.jhep.2010.04.037.
- Knolle, P. A.; Schmitt, E.; Jin, S.; Germann, T.; Duchmann, R.; Hegenbarth, S. et al. (1999): Induction of cytokine production in naive CD4(+) T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells. In: *Gastroenterology* 116 (6), S. 1428–1440. DOI: 10.1016/s0016-5085(99)70508-1.
- Komárek, Vladimír (2012): Gross Anatomy. In: Hans J. Hedrich (Hg.): *The laboratory mouse*. 2. ed. London: Academic Press (The Handbook of Experimental Animals), S. 145–159.
- Kou, Ziyue; Dai, Wei (2021): Aryl hydrocarbon receptor: Its roles in physiology. In: *Biochemical pharmacology* 185, S. 114428. DOI: 10.1016/j.bcp.2021.114428.
- Krenkel, Oliver; Tacke, Frank (2017): Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. In: *Nature reviews. Immunology* 17 (5), S. 306–321. DOI: 10.1038/nri.2017.11.
- Kruse, Nils; Neumann, Katrin; Schrage, Arnhold; Derkow, Katja; Schott, Eckart; Erben, Ulrike et al. (2009): Priming of CD4⁺ T cells by liver sinusoidal endothelial cells induces CD25^{low} forkhead box protein 3⁺ regulatory T cells suppressing autoimmune hepatitis. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 50 (6), S. 1904–1913. DOI: 10.1002/hep.23191.
- Lamb, Cheri L.; Cholico, Giovan N.; Pu, Xinzhu; Hagler, Gerald D.; Cornell, Kenneth A.; Mitchell, Kristen A. (2016): 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) increases necroinflammation and hepatic stellate cell activation but does not exacerbate experimental liver fibrosis in mice. In: *Toxicology and applied pharmacology* 311, S. 42–51. DOI: 10.1016/j.taap.2016.09.025.
- Larigot, Lucie; Juricek, Ludmila; Dairou, Julien; Coumoul, Xavier (2018): AhR signaling pathways and regulatory functions. In: *Biochimie open* 7, S. 1–9. DOI: 10.1016/j.biopen.2018.05.001.
- Lee, Chunja; Riddick, David S. (2012): Aryl hydrocarbon receptor-dependence of dioxin's effects on constitutive mouse hepatic cytochromes P450 and growth hormone signaling components. In: *Canadian journal of physiology and pharmacology* 90 (10), S. 1354–1363. DOI: 10.1139/y2012-099.
- Lee, Youjin; Awasthi, Amit; Yosef, Nir; Quintana, Francisco J.; Xiao, Sheng; Peters, Anneli et al. (2012): Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. In: *Nature immunology* 13 (10), S. 991–999. DOI: 10.1038/ni.2416.
- Lehmann, Geniece M.; Xi, Xia; Kulkarni, Ajit A.; Olsen, Keith C.; Pollock, Stephen J.; Baglole, Carolyn J. et al. (2011): The aryl hydrocarbon receptor ligand ITE inhibits TGFβ1-induced human myofibroblast differentiation. In: *The American journal of pathology* 178 (4), S. 1556–1567. DOI: 10.1016/j.ajpath.2010.12.025.
- Li, Wei; Chou, Sonja T.; Wang, Celso; Kuhr, Christian S.; Perkins, James D. (2004): Role of the liver in peripheral tolerance: induction through oral antigen feeding. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 4 (10), S. 1574–1582. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2004.00551.x.
- Liew, Pei Xiong; Kubes, Paul (2016): Microanatomy and Immunity in the Liver. In: *Encyclopedia of Immunobiology*: Elsevier, S. 434–442.

- Limmer, A.; Ohl, J.; Kurts, C.; Ljunggren, H. G.; Reiss, Y.; Groettrup, M. et al. (2000): Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8⁺ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. In: *Nature medicine* 6 (12), S. 1348–1354. DOI: 10.1038/82161.
- Limmer, Andreas; Ohl, Jutta; Wingender, Gerhard; Berg, Martina; Jüngerkes, Frank; Schumak, Beatrix et al. (2005): Cross-presentation of oral antigens by liver sinusoidal endothelial cells leads to CD8 T cell tolerance. In: *European journal of immunology* 35 (10), S. 2970–2981. DOI: 10.1002/eji.200526034.
- Liu, Wei; Hou, Yufang; Chen, Huahai; Wei, Handong; Lin, Weiran; Li, Jichang et al. (2011): Sample preparation method for isolation of single-cell types from mouse liver for proteomic studies. In: *Proteomics* 11 (17), S. 3556–3564. DOI: 10.1002/pmic.201100157.
- Liu, Yuying; Liang, Xiaoyu; Dong, Wenqian; Fang, Yi; Lv, Jiadi; Zhang, Tianzhen et al. (2018): Tumor-Repopulating Cells Induce PD-1 Expression in CD8⁺ T Cells by Transferring Kynurenine and AhR Activation. In: *Cancer cell* 33 (3), 480-494.e7. DOI: 10.1016/j.ccell.2018.02.005.
- Lo, Raymond; Matthews, Jason (2012): High-resolution genome-wide mapping of AHR and ARNT binding sites by ChIP-Seq. In: *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 130 (2), S. 349–361. DOI: 10.1093/toxsci/kfs253.
- Lommetz, Christoph (2022): Die Rolle des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors für die immunologische Funktion der sinusoidalen Leberendothelzellen. Dissertation. Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg. Zentrum für Innere Medizin, I. Medizinische Klinik und Poliklinik. Online verfügbar unter <http://d-nb.info/1253996539/34>.
- Lüth, Stefan; Huber, Samuel; Schramm, Christoph; Buch, Thorsten; Zander, Stefan; Stadelmann, Christine et al. (2008): Ectopic expression of neural autoantigen in mouse liver suppresses experimental autoimmune neuroinflammation by inducing antigen-specific Tregs. In: *The Journal of clinical investigation* 118 (10), S. 3403–3410. DOI: 10.1172/JCI32132.
- MacParland, Sonya A.; Liu, Jeff C.; Ma, Xue-Zhong; Innes, Brendan T.; Bartczak, Agata M.; Gage, Blair K. et al. (2018): Single cell RNA sequencing of human liver reveals distinct intrahepatic macrophage populations. In: *Nature communications* 9 (1), S. 4383. DOI: 10.1038/s41467-018-06318-7.
- Maitra, Dhiman; Bragazzi Cunha, Juliana; Elenbaas, Jared S.; Bonkovsky, Herbert L.; Shavit, Jordan A.; Omary, M. Bishr (2019): Porphyrin-Induced Protein Oxidation and Aggregation as a Mechanism of Porphyria-Associated Cell Injury. In: *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology* 8 (4), S. 535–548. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2019.06.006.
- Mariotti, Valeria; Cadamuro, Massimiliano; Spirli, Carlo; Fiorotto, Romina; Strazzabosco, Mario; Fabris, Luca (2019): Animal models of cholestasis: An update on inflammatory cholangiopathies. In: *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease* 1865 (5), S. 954–964. DOI: 10.1016/j.bbadis.2018.07.025.
- Mates, Jessica M.; Yao, Zhili; Cheplowitz, Alana M.; Suer, Ozan; Phillips, Gary S.; Kwiek, Jesse J. et al. (2017): Mouse Liver Sinusoidal Endothelium Eliminates HIV-Like Particles from Blood at a Rate of 100 Million per Minute by a Second-Order Kinetic Process. In: *Frontiers in immunology* 8, S. 35. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00035.
- Matta, Benjamin M.; Castellaneta, Antonino; Thomson, Angus W. (2010): Tolerogenic plasmacytoid DC. In: *European journal of immunology* 40 (10), S. 2667–2676. DOI: 10.1002/eji.201040839.

- Mauad, T. H.; van Nieuwkerk, C. M.; Dingemans, K. P.; Smit, J. J.; Schinkel, A. H.; Notenboom, R. G. et al. (1994): Mice with homozygous disruption of the *mdr2* P-glycoprotein gene. A novel animal model for studies of nonsuppurative inflammatory cholangitis and hepatocarcinogenesis. In: *The American journal of pathology* 145 (5), S. 1237–1245.
- McGargill, Maureen A.; Mayerova, Dita; Stefanski, Heather E.; Koehn, Brent; Parke, Evan A.; Jameson, Stephen C. et al. (2002): A spontaneous CD8 T cell-dependent autoimmune disease to an antigen expressed under the human keratin 14 promoter. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 169 (4), S. 2141–2147.
- McGovern, Karen; Castro, Alfredo C.; Cavanaugh, Jill; Coma, Silvia; Walsh, Meghan; Tchaicha, Jeremy et al. (2022): Discovery and Characterization of a Novel Aryl Hydrocarbon Receptor Inhibitor, IK-175, and Its Inhibitory Activity on Tumor Immune Suppression. In: *Molecular cancer therapeutics* 21 (8), S. 1261–1272. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-21-0984.
- MedChemExpress: ITE. Cat. No.: HY-19317. Online verfügbar unter <https://www.medchemexpress.com/ITE.html>, zuletzt geprüft am 28.07.2024.
- Mescher, Anthony L.; Junqueira, Luiz Carlos Uchôa (2013): Junqueira's basic histology. Text and atlas. Thirteenth edition. New York: McGraw-Hill Medical (Lange medical book).
- Mezrich, Joshua D.; Fechner, John H.; Zhang, Xiaoji; Johnson, Brian P.; Burlingham, William J.; Bradfield, Christopher A. (2010): An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185 (6), S. 3190–3198. DOI: 10.4049/jimmunol.0903670.
- Murray, Iain A.; Perdew, Gary H. (2020): How Ah Receptor Ligand Specificity Became Important in Understanding Its Physiological Function. In: *International journal of molecular sciences* 21 (24). DOI: 10.3390/ijms21249614.
- Musrati, Mohamed Amer; Baetselier, Patrick de; Movahedi, Kiavash; van Ginderachter, Jo A. (2023): Ontogeny, functions and reprogramming of Kupffer cells upon infectious disease. In: *Frontiers in immunology* 14, S. 1238452. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1238452.
- Nakai, Masato; Oshiumi, Hiroyuki; Funami, Kenji; Okamoto, Masaaki; Matsumoto, Misako; Seya, Tsukasa; Sakamoto, Naoya (2015): Interferon (IFN) and Cellular Immune Response Evoked in RNA-Pattern Sensing During Infection with Hepatitis C Virus (HCV). In: *Sensors (Basel, Switzerland)* 15 (10), S. 27160–27173. DOI: 10.3390/s151027160.
- Neumann, Katrin; Rudolph, Christine; Neumann, Christian; Janke, Marko; Amsen, Derk; Scheffold, Alexander (2015): Liver sinusoidal endothelial cells induce immunosuppressive IL-10-producing Th1 cells via the Notch pathway. In: *European journal of immunology* 45 (7), S. 2008–2016. DOI: 10.1002/eji.201445346.
- Nguyen, Linh P.; Bradfield, Christopher A. (2008): The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. In: *Chemical research in toxicology* 21 (1), S. 102–116. DOI: 10.1021/tx7001965.

- Nguyen, Nam Trung; Kimura, Akihiro; Nakahama, Taisuke; Chinen, Ichino; Masuda, Kazuya; Nohara, Keiko et al. (2010): Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (46), S. 19961–19966. DOI: 10.1073/pnas.1014465107.
- Nguyen, Nam Trung; Nakahama, Taisuke; Le, Duc Hoang; van Son; Chu, Ha Hoang; Kishimoto, Tadimitsu (2014): Aryl hydrocarbon receptor and kynurenine: recent advances in autoimmune disease research. In: *Frontiers in immunology* 5, S. 551. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00551.
- Norris, Callie A.; He, Mu; Kang, Liang-I; Ding, Michael Qi; Radder, Josiah E.; Haynes, Meagan M. et al. (2014): Synthesis of IL-6 by hepatocytes is a normal response to common hepatic stimuli. In: *PloS one* 9 (4), e96053. DOI: 10.1371/journal.pone.0096053.
- Nugent, Lindsey F.; Shi, Guangpu; Vistica, Barbara P.; Ogbeifun, Osato; Hinshaw, Samuel J. H.; Gery, Igal (2013): ITE, a novel endogenous nontoxic aryl hydrocarbon receptor ligand, efficiently suppresses EAU and T-cell-mediated immunity. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 54 (12), S. 7463–7469. DOI: 10.1167/iovs.12-11479.
- Ochel, Aaron; Cebula, Marcin; Riehn, Mathias; Hillebrand, Upneet; Lipps, Christoph; Schirmbeck, Reinhold et al. (2016): Effective intrahepatic CD8+ T-cell immune responses are induced by low but not high numbers of antigen-expressing hepatocytes. In: *Cell Mol Immunol* 13 (6), S. 805–815. DOI: 10.1038/cmi.2015.80.
- Ozeki, Jun; Uno, Shigeyuki; Ogura, Michitaka; Choi, Mihwa; Maeda, Tetsuyo; Sakurai, Kenichi et al. (2011): Aryl hydrocarbon receptor ligand 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin enhances liver damage in bile duct-ligated mice. In: *Toxicology* 280 (1-2), S. 10–17. DOI: 10.1016/j.tox.2010.11.003.
- Pallotta, Maria Teresa; Rossini, Sofia; Suvieri, Chiara; Coletti, Alice; Orabona, Ciriana; Macchiarulo, Antonio et al. (2022): Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1): an up-to-date overview of an eclectic immunoregulatory enzyme. In: *The FEBS journal* 289 (20), S. 6099–6118. DOI: 10.1111/febs.16086.
- Paris, Anaïs; Tardif, Nina; Galibert, Marie-Dominique; Corre, Sébastien (2021): AhR and Cancer: From Gene Profiling to Targeted Therapy. In: *International journal of molecular sciences* 22 (2). DOI: 10.3390/ijms22020752.
- Park, Joo-Hung; Hahn, Eun-Jin; Kong, Ji-Hye; Cho, Hyun-Jin; Yoon, Chun-Sik; Cheong, Seon-Woo et al. (2003): TCDD-induced apoptosis in EL-4 cells deficient of the aryl hydrocarbon receptor and down-regulation of IGFBP-6 prevented the apoptotic cell death. In: *Toxicology letters* 145 (1), S. 55–68. DOI: 10.1016/s0378-4274(03)00259-5.
- Patil, Nikhil Y.; Friedman, Jacob E.; Joshi, Aditya D. (2023): Role of Hepatic Aryl Hydrocarbon Receptor in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. In: *Receptors (Basel, Switzerland)* 2 (1), S. 1–15. DOI: 10.3390/receptors2010001.
- Payne, Sophie; Val, Sarah de; Neal, Alice (2018): Endothelial-Specific Cre Mouse Models. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 38 (11), S. 2550–2561. DOI: 10.1161/ATVBAHA.118.309669.
- Pierre, Stéphane; Chevallier, Aline; Teixeira-Clerc, Fatima; Ambolet-Camoit, Ariane; Bui, Linh-Chi; Bats, Anne-Sophie et al. (2014): Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of liver fibrosis by dioxin. In: *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 137 (1), S. 114–124. DOI: 10.1093/toxsci/kft236.

- Poland, Alan; Palen, David; Glover, Ed (1994): Analysis of the four alleles of the murine aryl hydrocarbon receptor. In: *Molecular pharmacology* 46 (5), S. 915–921.
- Pose, Elisa; Sancho-Bru, Pau; Coll, Mar (2019): 3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-Dihydrocolidine Diet: A Rodent Model in Cholestasis Research. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1981, S. 249–257. DOI: 10.1007/978-1-4939-9420-5_16.
- Poulain-Godefroy, Odile; Bouté, Mélodie; Carrard, Julie; Alvarez-Simon, Daniel; Tsicopoulos, Anne; Nadai, Patricia de (2020): The Aryl Hydrocarbon Receptor in Asthma: Friend or Foe? In: *International journal of molecular sciences* 21 (22). DOI: 10.3390/ijms21228797.
- Prasad Singh, Narendra; Nagarkatti, Mitzi; Nagarkatti, Prakash (2020): From Suppressor T cells to Regulatory T cells: How the Journey That Began with the Discovery of the Toxic Effects of TCDD Led to Better Understanding of the Role of AhR in Immunoregulation. In: *International journal of molecular sciences* 21 (21). DOI: 10.3390/ijms21217849.
- Quintana, Francisco J.; Murugaiyan, Gopal; Farez, Mauricio F.; Mitsdoerffer, Meike; Tukupah, Ann-Marcia; Burns, Evan J.; Weiner, Howard L. (2010): An endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand acts on dendritic cells and T cells to suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (48), S. 20768–20773. DOI: 10.1073/pnas.1009201107.
- Rothhammer, Veit; Quintana, Francisco J. (2019): The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. In: *Nature reviews. Immunology* 19 (3), S. 184–197. DOI: 10.1038/s41577-019-0125-8.
- Sartor, Maureen A.; Schnekenburger, Michael; Marlowe, Jennifer L.; Reichard, John F.; Wang, Ying; Fan, Yunxia et al. (2009): Genomewide analysis of aryl hydrocarbon receptor binding targets reveals an extensive array of gene clusters that control morphogenetic and developmental programs. In: *Environmental health perspectives* 117 (7), S. 1139–1146. DOI: 10.1289/ehp.0800485.
- Schuran, Fenja A.; Lommetz, Christoph; Steudter, Andreas; Ghallab, Ahmed; Wieschendorf, Björn; Schwinge, Dorothee et al. (2021): Aryl Hydrocarbon Receptor Activity in Hepatocytes Sensitizes to Hyperacute Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Mice. In: *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology* 11 (2), S. 371–388. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2020.09.002.
- Schurich, Anna; Berg, Martina; Stabenow, Dirk; Bottcher, Jan; Kern, Michaela; Schild, Hans-Jorg et al. (2010): Dynamic regulation of CD8 T cell tolerance induction by liver sinusoidal endothelial cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184 (8), S. 4107–4114. DOI: 10.4049/jimmunol.0902580.
- Schwinge, Dorothee; Carambia, Antonella; Quaas, Alexander; Krech, Till; Wegscheid, Claudia; Tiegs, Gisa et al. (2015): Testosterone suppresses hepatic inflammation by the downregulation of IL-17, CXCL-9, and CXCL-10 in a mouse model of experimental acute cholangitis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 194 (6), S. 2522–2530. DOI: 10.4049/jimmunol.1400076.
- Seki, Ekihiro; Brenner, David A. (2008): Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 48 (1), S. 322–335. DOI: 10.1002/hep.22306.

- Shin, June Ho; Zhang, Luhua; Murillo-Sauca, Oihana; Kim, Junmo; Kohrt, Holbrook E. K.; Bui, Jack D.; Sunwoo, John B. (2013): Modulation of natural killer cell antitumor activity by the aryl hydrocarbon receptor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (30), S. 12391–12396. DOI: 10.1073/pnas.1302856110.
- Shinde, Rahul; Hezaveh, Kebria; Halaby, Marie Jo; Kloetgen, Andreas; Chakravarthy, Ankur; Da Silva Medina, Tiago et al. (2018): Apoptotic cell-induced AhR activity is required for immunological tolerance and suppression of systemic lupus erythematosus in mice and humans. In: *Nature immunology* 19 (6), S. 571–582. DOI: 10.1038/s41590-018-0107-1.
- Shinde, Rahul; McGaha, Tracy L. (2018): The Aryl Hydrocarbon Receptor: Connecting Immunity to the Microenvironment. In: *Trends in Immunology* 39 (12), S. 1005–1020. DOI: 10.1016/j.it.2018.10.010.
- Simones, Tom; Shepherd, David M. (2011): Consequences of AhR activation in steady-state dendritic cells. In: *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 119 (2), S. 293–307. DOI: 10.1093/toxsci/kfq354.
- Soshilov, Anatoly A.; Denison, Michael S. (2014): Ligand promiscuity of aryl hydrocarbon receptor agonists and antagonists revealed by site-directed mutagenesis. In: *Molecular and cellular biology* 34 (9), S. 1707–1719. DOI: 10.1128/MCB.01183-13.
- Stein, Stephanie; Henze, Lara; Poch, Tobias; Carambia, Antonella; Krech, Till; Preti, Max et al. (2021): IL-17A/F enable cholangiocytes to restrict T cell-driven experimental cholangitis by upregulating PD-L1 expression. In: *Journal of hepatology* 74 (4), S. 919–930. DOI: 10.1016/j.jhep.2020.10.035.
- Stejskalova, Lucie; Dvorak, Zdenek; Pavek, Petr (2011): Endogenous and exogenous ligands of aryl hydrocarbon receptor: current state of art. In: *Current drug metabolism* 12 (2), S. 198–212. DOI: 10.2174/138920011795016818.
- Stockinger, Brigitta; Di Meglio, Paola; Gialitakis, Manolis; Duarte, Joao H. (2014): The aryl hydrocarbon receptor: multitasking in the immune system. In: *Annual review of immunology* 32, S. 403–432. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032713-120245.
- Takenaka, Maisa C.; Quintana, Francisco J. (2016): Tolerogenic dendritic cells. In: *Seminars in immunopathology*. DOI: 10.1007/s00281-016-0587-8.
- Thomson, Angus W.; Knolle, Percy A. (2010): Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. In: *Nature reviews. Immunology* 10 (11), S. 753–766. DOI: 10.1038/nri2858.
- Thomson, Angus W.; Vionnet, Julien; Sanchez-Fueyo, Alberto (2020): Understanding, predicting and achieving liver transplant tolerance: from bench to bedside. In: *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 17 (12), S. 719–739. DOI: 10.1038/s41575-020-0334-4.
- Tokita, Daisuke; Shishida, Masayuki; Ohdan, Hideki; Onoe, Takashi; Hara, Hidetaka; Tanaka, Yuka et al. (2006): Liver sinusoidal endothelial cells that endocytose allogeneic cells suppress T cells with indirect allospecificity. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 177 (6), S. 3615–3624. DOI: 10.4049/jimmunol.177.6.3615.
- Uhrig, Anja; Banafsche, Ramin; Kremer, Michael; Hegenbarth, Silke; Hamann, Alf; Neurath, Markus et al. (2005): Development and functional consequences of LPS tolerance in sinusoidal endothelial cells of the liver. In: *Journal of leukocyte biology* 77 (5), S. 626–633. DOI: 10.1189/jlb.0604332.

- van Nieuwerk, Carin M.J.; Groen, albert K.; Ottenhoff, Roelof; van Wijland, Michael; van den Bergh Weerman, Marius A.; Tytgat, Guido N.J. et al. (1997): The role of bile salt composition in liver pathology of *mdr2* ($-/-$) mice. Differences between males and females. In: *Journal of hepatology* 26 (1), S. 138–145. DOI: 10.1016/S0168-8278(97)80020-7.
- Vogel, Christoph F. A.; Goth, Samuel R.; Dong, Bin; Pessah, Isaac N.; Matsumura, Fumio (2008): Aryl hydrocarbon receptor signaling mediates expression of indoleamine 2,3-dioxygenase. In: *Biochemical and biophysical research communications* 375 (3), S. 331–335. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.07.156.
- Vollmar, Brigitte; Menger, Michael D. (2009): The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. In: *Physiological reviews* 89 (4), S. 1269–1339. DOI: 10.1152/physrev.00027.2008.
- Walisser, Jacqueline A.; Glover, Edward; Pande, Kalyan; Liss, Adam L.; Bradfield, Christopher A. (2005): Aryl hydrocarbon receptor-dependent liver development and hepatotoxicity are mediated by different cell types. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (49), S. 17858–17863. DOI: 10.1073/pnas.0504757102.
- Wang, Gui-Zhen; Zhang, Li; Zhao, Xin-Chun; Gao, San-Hui; Qu, Li-Wei; Yu, Hong et al. (2019): The Aryl hydrocarbon receptor mediates tobacco-induced PD-L1 expression and is associated with response to immunotherapy. In: *Nature communications* 10 (1), S. 1125. DOI: 10.1038/s41467-019-08887-7.
- Warren, Alessandra; Le Couteur, David G.; Fraser, Robin; Bowen, David G.; McCaughan, Geoffrey W.; Bertolino, Patrick (2006): T lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 44 (5), S. 1182–1190. DOI: 10.1002/hep.21378.
- Weiner, Howard L.; da Cunha, Andre Pires; Quintana, Francisco; Wu, Henry (2011): Oral tolerance. In: *Immunological reviews* 241 (1), S. 241–259. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2011.01017.x.
- Wiegard, Christiane; Wolint, Petra; Frenzel, Christian; Cheruti, Uta; Schmitt, Edgar; Oxenius, Annette et al. (2007): Defective T helper response of hepatocyte-stimulated CD4 T cells impairs antiviral CD8 response and viral clearance. In: *Gastroenterology* 133 (6), S. 2010–2018. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.09.007.
- Wilson, Rachel H.; Carney, Patrick R.; Glover, Edward; Parrott, Jessica C.; Rojas, Brenda L.; Moran, Susan M. et al. (2021): Generation of an Allelic Series at the Ahr Locus Using an Edited Recombinant Approach. In: *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 180 (2), S. 239–251. DOI: 10.1093/toxsci/kfab005.
- Wu, Jun; Meng, Zhongji; Jiang, Min; Zhang, Ejuan; Trippler, Martin; Broering, Ruth et al. (2010): Toll-like receptor-induced innate immune responses in non-parenchymal liver cells are cell type-specific. In: *Immunology* 129 (3), S. 363–374. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2009.03179.x.
- Xia, Sheng; Guo, Zhenhong; Xu, Xiongfei; Yi, Hai; Wang, Quanxing; Cao, Xuetao (2008): Hepatic microenvironment programs hematopoietic progenitor differentiation into regulatory dendritic cells, maintaining liver tolerance. In: *Blood* 112 (8), S. 3175–3185. DOI: 10.1182/blood-2008-05-159921.

- Xiong, Lifeng; Dean, Joseph W.; Fu, Zheng; Oliff, Kristen N.; Bostick, John W.; Ye, Jian et al. (2020): Ahr-Foxp3-ROR γ t axis controls gut homing of CD4⁺ T cells by regulating GPR15. In: *Science immunology* 5 (48). DOI: 10.1126/sciimmunol.aaz7277.
- Yan, Jiong; Tung, Hung-Chun; Li, Sihan; Niu, Yongdong; Garbacz, Wojciech G.; Lu, Peipei et al. (2019): Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling Prevents Activation of Hepatic Stellate Cells and Liver Fibrogenesis in Mice. In: *Gastroenterology* 157 (3), 793-806.e14. DOI: 10.1053/j.gastro.2019.05.066.
- Ye, Jian; Qiu, Ju; Bostick, John W.; Ueda, Aki; Schjerven, Hilde; Li, Shiyang et al. (2017): The Aryl Hydrocarbon Receptor Preferentially Marks and Promotes Gut Regulatory T Cells. In: *Cell reports* 21 (8), S. 2277–2290. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.10.114.
- Yeste, Ada; Takenaka, Maisa C.; Mascanfroni, Ivan D.; Nadeau, Meghan; Kenison, Jessica E.; Patel, Bonny et al. (2016): Tolerogenic nanoparticles inhibit T cell-mediated autoimmunity through SOCS2. In: *Science signaling* 9 (433), ra61. DOI: 10.1126/scisignal.aad0612.
- Yokoyama, Yukihiro; Kitchens, William C.; Toth, Balazs; Schwacha, Martin G.; Rue, Loring W.; Bland, Kirby I.; Chaudry, Irshad H. (2004): Role of IL-10 in regulating proinflammatory cytokine release by Kupffer cells following trauma-hemorrhage. In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 286 (6), G942-6. DOI: 10.1152/ajpgi.00502.2003.
- Zhao, Bin; Degroot, Danica E.; Hayashi, Ai; He, Guochun; Denison, Michael S. (2010): CH223191 is a ligand-selective antagonist of the Ah (Dioxin) receptor. In: *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 117 (2), S. 393–403. DOI: 10.1093/toxsci/kfq217.
- Zheng, Meijuan; Tian, Zhigang (2019): Liver-Mediated Adaptive Immune Tolerance. In: *Frontiers in immunology* 10, S. 2525. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02525.
- Zhou, Liang (2016): AHR Function in Lymphocytes: Emerging Concepts. In: *Trends in Immunology* 37 (1), S. 17–31. DOI: 10.1016/j.it.2015.11.007.

10. Anhang

<i>Genotyp</i>	<i>Geschlecht</i>	<i>Alter</i>		
		<i>4 we</i> <i>n (n Kontrollen)</i>	<i>8 we</i> <i>n (n Kontrollen)</i>	<i>12 we</i> <i>n (n Kontrollen)</i>
<i>Mdr2^{-/-} Ahr^{ΔAlb}</i>	♀	2 (6)	6 (6)	0 (0)
	♂	4 (1)	6 (3)	0 (0)
<i>Mdr2^{-/-} Ahr^{ΔCdh5}</i>	♀	10 (15)	6 (6)	0 (0)
	♂	5 (7)	6 (6)	3 (0)
<i>Mdr2^{-/-} Ahr^{ΔItgax}</i>	♀	5 (5)	6 (4)	2 (3)
	♂	6 (7)	6 (5)	1 (4)

Tabelle 14: Gruppenverteilung bei *Mdr2^{-/-}* mit konditionellen *Ahr*-Knockouts in Leberzellen. „n Kontrollen“ ist jeweils die Anzahl gleichaltriger gleichgeschlechtlicher *Mdr2^{-/-} Ahr^{fl/fl}* Wurfgeschwister.

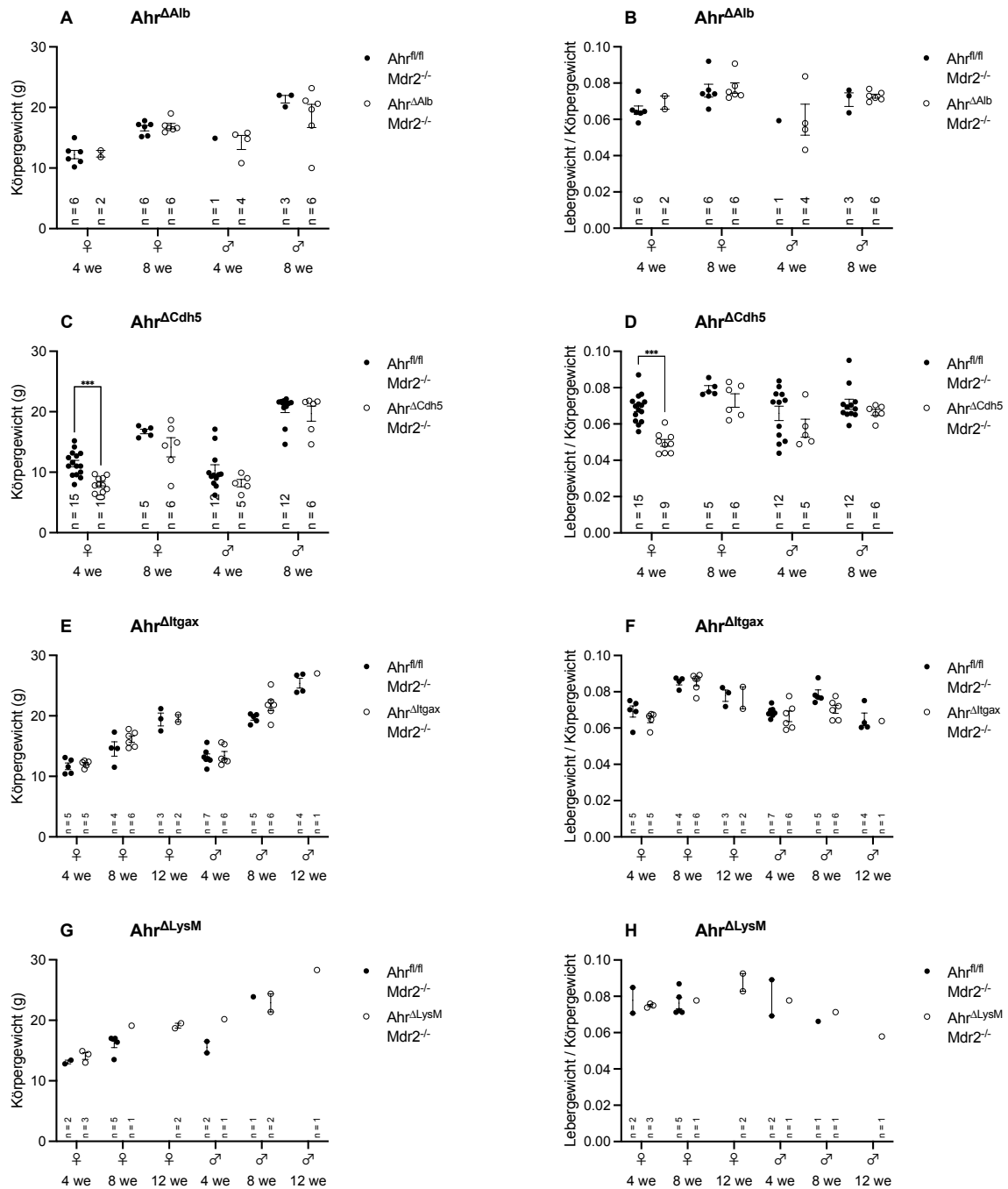


Abbildung 29: Körper- und Lebergewichte bei Mdr2^{-/-} Mäusen mit konditionellen Ahr-Knockouts in Leberzellen. Weibliche (♀) und männliche (♂) Mdr2^{-/-} Mäuse mit konditionellen Ahr-Knockouts in Hepatozyten ($Ahr^{\Delta Alb}$), Endothelzellen ($Ahr^{\Delta Cdh5}$), CD11c⁺ dendritischen Zellen ($Ahr^{\Delta Itgax}$) und Kontrollen ohne Ahr-Knockouts ($Ahr^{fl/fl}$) gleichen Geschlechts wurden zu drei Zeitpunkten (vier, acht, zwölf Wochen) analysiert. Jeweils Körpergewichte und Leber- / Körpergewichtsverhältnisse in (A, B) Mdr2^{-/-} $Ahr^{\Delta Alb}$, (C, D) Mdr2^{-/-} $Ahr^{\Delta Cdh5}$, (E, F) Mdr2^{-/-} $Ahr^{\Delta Itgax}$, (G, H) Mdr2^{-/-} $Ahr^{\Delta LysM}$ Mäusen. ***: p < 0,001.

Danksagung

Ich danke euch und Ihnen allen, die meine Promotion ermöglicht und unterstützt haben, von ganzem Herzen.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Antonella Carambia für ihr Vertrauen, für Rat und Tat seit dem ersten Tag, Socken zum Kälteein- und Snickers zum Kreislaufzusammenbruch.

Gleichermaßen danke ich meinem Doktorvater Professor Johannes Herkel für seine offene Tür und Unterstützung über all die Jahre und nach all den Jahren.

Danke, dass ihr mir diese Arbeit anvertraut habt und Danke für die beste Betreuung, die ich mir hätte wünschen können.

Riesige Dankeschöns gebühren Gela Schmidt, Sabrina Kreß, Marko Hilken und Dr. Dorothee Schwinge für unerschöpfliche Hilfe und Geduld über das gesamte Spektrum von Laboralltag bis Katastrophe.

Darüber hinaus jedem Einzelnen und allen gemeinsam im O58-Arbeitsgruppenamalgamat: Danke für sämtlichen Beistand und Danke für eine wirklich schöne Laborzeit, an die ich mich gern erinnere.

Für Brot und Wasser sorgte mir ein Doktorandenstipendium des Graduiertenkollegs im Sonderforschungsbereich 841: Für Förderung und Freiheit kann ich allen beteiligten Köpfen, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg nicht genug danken.

Unschätzbar dankbar bin ich meiner Familie, meiner Freundin und meinen Freunden. Ohne euren jahre- und jahrzehntelangen Rückhalt geht gar nichts.

Danke!

Erklärung des Eigenanteils

Die vorliegende Arbeit wurde von Dr. Antonella Carambia (Postdoc) und Prof. Johannes Herkel (Arbeitsgruppenleiter) betreut und in der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Zentrums für Innere Medizin und im Rahmen des Teilprojektes B2 des Sonderforschungsbereichs 841 „Leberentzündung: Infektion, Immunregulation und Konsequenzen“ am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

Die Studie wurde von Dr. Antonella Carambia und Prof. Johannes Herkel konzipiert.

Ich erhielt technische Unterstützung von Gela Schmidt bei den histologischen Zuschnitten und Färbungen, Sabrina Kreß bei der Zellkultur und Marko Hilken bei der Genotypisierung der Versuchstiere. Die Serum-Transaminasenaktivitäten wurden durch die technischen Assistentinnen und Assistenten des Instituts für Experimentelle Hepatologie und Immunologie gemessen, die Entwässerung und Paraffinierung von Gewebeproben wurden von den technischen Assistentinnen und Assistenten des Instituts für Pathologie durchgeführt. Intravenöse Injektionen (Zelltransfer im K14-OVAp-Modell) nahm Dr. Antonella Carambia vor.

Alle anderen Versuche wurden von mir durchgeführt.

Ich habe die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfsmittel verfasst.

Hamburg, 4. November 2024

Andreas Steudter

Eidesstattliche Versicherung

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

Beim Verfassen der Dissertation habe ich keine KI-basierte Tools („Chatbots“) verwendet. Die „Stellungnahme des Präsidiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zum Einfluss generativer Modelle für die Text- und Bilderstellung auf die Wissenschaften und das Förderhandeln der DFG“ aus September 2023 habe ich beachtet.

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

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

Hamburg, 4. November 2024

Andreas Steudter