

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Innere Medizin
I. Medizinische Klinik und Poliklinik

Prof. Dr. med. Ansgar W. Lohse

Die Rolle des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors für die immunologische Funktion der sinusoidalen Leberendothelzellen

Dissertation

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

vorgelegt von:

Christoph Lommetz
aus Tönisvorst

Hamburg 2022

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 25.02.2022**

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Jörg Heeren

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Johannes Herkel

Inhaltsverzeichnis

1	Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2	Einleitung	2
2.1	Die Leber als immunologisches Organ	2
2.2	Mikroanatomischer Aufbau der Leber	3
2.3	Antigen-präsentierende Zellen der Leber	5
2.3.1	Hepatozyten	5
2.3.2	Dendritische Zellen (DC)	6
2.3.3	Ito- Zellen	6
2.3.4	Kupffer Zellen (KC)	7
2.3.5	Sinusoidale Endothelzellen der Leber (LSEC)	8
2.4	Der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor	13
2.5	Ahr-Signalwege	13
2.6	Die Rolle des Ahr in angeborenen und adaptiven Immunantworten	15
2.6.1	Ahr in regulatorischen T-Zellen	15
2.6.2	Ahr in T _H 17 Zellen	16
2.6.3	Ahr in „innate lymphoid cells“ (ILC) und NK-Zellen	18
2.6.4	Ahr in APCs	17
2.7	Ahr-Liganden	19
2.7.1	Exogene Liganden	19
2.7.2	Endogene Liganden	20
2.8	Bedeutung des Ahr in der Leber	21
2.8.1	Auswirkung eines fehlenden Ahr auf Funktion und Anatomie der Leber	21
2.8.2	Die Rolle der Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO2) in der Leber	21
2.8.3	Die Rolle des Ahr in der LPS-Toleranz	22
3	Material und Methoden	23
3.1	Materialien	23
3.1.1	Geräte	23
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	24
3.1.3	Lösungen, Flüssigkeiten und Chemikalien	26
3.1.4	Puffer	28
3.1.5	Antikörper	29
3.1.6	Kits	30
3.1.7	Sonden für die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	30
3.1.8	Versuchstiere	31
3.1.9	Software	32

3.2	Methoden	33
3.2.1	Isolation von sinusoidalen Leberendothelzellen	33
3.2.2	Zellkultur	34
3.2.3	Charakterisierung von Zellen	35
3.2.4	Molekularbiologische Methoden	38
3.2.5	Histologische Untersuchung von Leberschnitten	42
3.2.6	Immunfluoreszenz-Färbung	43
3.2.7	Messung von Transaminasen	43
3.2.8	Behandlung mit Lipopolysaccharid	44
3.2.9	Statistik	44
4	Ergebnisse	45
4.1	Charakterisierung der immunologischen Ahr-Funktion in sinusoidalen Leberendothelzellen (LSECs)	45
4.1.1	Nachweis des Ahr in LSECs	45
4.1.2	Stimulation von LSECs mit Ahr-Liganden und Inhibitoren <i>in vitro</i>	46
4.1.3	Stimulation Ahr-defizienter LSECs <i>in vitro</i>	55
4.2	Bedeutung des Ahr für die Etablierung von LPS-Toleranz <i>in vivo</i>	56
4.3	Phänotypische Merkmale von Mäusen der Linie Cdh-5^{Δ/ΔAhr}	61
4.3.1	Makroskopischer Phänotyp	61
4.3.2	Mikroskopischer Phänotyp	65
5	Diskussion	70
5.1	Die Rolle des Ahr für die immunologische Funktion der LSECs	70
5.2	Bedeutung des Ahr für die Etablierung von LPS-Toleranz <i>in vivo</i>	74
5.3	Phänotypische Merkmale von Mäusen der Linie Cdh-5^{Δ/ΔAhr}	77
5.4	Ausblick	80
5.4.1	Die Rolle des Ahr für die immunologische Funktion der LSECs	80
5.4.2	Bedeutung des Ahr für die Etablierung von LPS-Toleranz <i>in vivo</i>	81
5.4.3	Phänotypische Merkmale von Mäusen der Linie Cdh-5 ^{Δ/ΔAhr}	82
6	Zusammenfassung	83
7	Summary	84
8	Abkürzungsverzeichnis	85
9	Abbildungsverzeichnis	88
10	Tabellenverzeichnis	89
11	Literaturverzeichnis	90
12	Danksagung	98
13	Lebenslauf	99
14	Eidesstattliche Versicherung	100

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Unter physiologischen Bedingungen herrscht in der Leber ein tolerogenes Milieu vor, welches eine überschießende Reaktion des Immunsystems gegenüber harmlosen Antigenen verhindert. Dieses tolerogene Milieu wird vor allem von den leberresidenten Antigen-präsentierenden Zellen (APC) etabliert, zu denen auch die sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) gezählt werden (Thomson and Knolle, 2010). In der Leber übernehmen LSECs viele immunologisch relevante Funktionen, wie die Produktion und Sekretion antientzündlicher Mediatoren und die tolerogene Stimulation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (Thomson and Knolle, 2010). Außerdem sind LSECs essenziell an der hepatischen Toleranz gegenüber LPS beteiligt (Uhrig et al., 2005).

Der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (Ahr) ist unter anderem für seine immunmodulierenden Funktionen bekannt. Er kann sowohl eine pro- als auch eine antiinflammatorische Wirkung vermitteln (Quintana and Sherr, 2013). In APCs spielt der Ahr eine wichtige immunologische Rolle, unter anderem in der Regulation von Zytokinantworten (Kimura et al., 2009, Bankoti et al., 2010b, Simones and Shepherd, 2011). Des Weiteren ist bekannt, dass der Ahr auch an der Etablierung von LPS-Toleranz entscheidend beteiligt ist (Bessede et al., 2014).

Über eine mögliche immunologische Funktion des Ahr in LSECs ist bisher nichts bekannt. Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung des Ahr für die immunologische Funktion der LSECs, insbesondere in Hinblick auf die hepatische LPS-Toleranz zu untersuchen.

Spezifische Ziele:

1. Charakterisierung der immunologischen Ahr-Funktion in primären LSECs *in vitro*:
Hierzu wurden LSECs mit chemischen Ahr-Agonisten und Antagonisten behandelt, sowie Experimente mit Ahr-defizienten LSECs durchgeführt.
2. Charakterisierung der immunologischen Ahr-Funktion in LSECs *in vivo* am Beispiel der LPS-Toleranz:
Mittels konditionaler Mäuse mit Endothel-spezifischer Ahr-Defizienz (Cdh-5^{Δ/ΔAhr}) wurde untersucht, inwiefern der Ahr spezifisch in Endothelzellen für die Aufrechterhaltung der LPS-Toleranz *in vivo* von Bedeutung ist.
3. Charakterisierung des Phänotyps der Cdh-5^{Δ/ΔAhr} Mäuse:
Eine komplette Ahr-Defizienz bedingt einen speziellen Phänotyp, der unter anderem mit Immundefekten und Leberpathologien einhergeht (Fernandez-Salguero et al., 1997, Schmidt et al., 1996). Fehlt der Ahr nur in einzelnen Leberzelltypen, lassen sich ebenfalls charakteristische Veränderungen beschreiben (Walisser et al., 2005). Daher wurden die Cdh-5^{Δ/ΔAhr} Mäuse auf mögliche neue und bereits beschriebene Anomalien untersucht.

2 Einleitung

2.1 Die Leber als immunologisches Organ

Die Leber erfüllt als größte Drüse des Organismus eine Vielzahl unterschiedlicher Aufgaben. Neben ihrer Rolle als zentrales Stoffwechselorgan besitzt die Leber auch eine wichtige immunologische Funktion.

Jede Minute erreichen die Leber ca. 30 % des gesamten Blutvolumens (Sheth K, 2001). 75 - 80 % dieses Blutes stammen aus den unpaaren Bauchorganen und gelangen über die Pfortader in die Leber. Dieses Blut enthält eine hohe Konzentration an Nährstoffen und bakteriellen Antigenen wie z.B. das Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS), ein Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien. Die verbleibenden 20 – 25 % stammen aus der arteriellen Versorgung der Leber über die Arteria hepatica und beinhalten vor allem Antigene in Form von alten oder nicht mehr voll funktionsfähigen Zellen, die in der Leber aus dem Blut entfernt und abgebaut werden (Bogdanos et al., 2013). Zusammen mit den in der Leber, während der Metabolisierung und Detoxifikation, entstehenden Neoantigenen (z.B. beim Abbau von Alkohol) sieht sich die Leber so kontinuierlich mit einer Vielzahl größtenteils harmloser Antigene konfrontiert. Um eine überschießende Antwort des Immunsystems gegenüber diesen Antigenen zu vermeiden, ist die Leber in der Lage unter physiologischen Bedingungen ein tolerogenes Milieu zu etablieren, ohne dabei die Fähigkeit zu verlieren ernsthafte Bedrohungen, wie bakterielle oder virale Infektionen, zu erkennen und zu beseitigen (Thomson and Knolle, 2010, Horst et al., 2016). Neben den lokalen tolerogenen Effekten vermittelt die Leber auch systemisch toleranzfördernde Eigenschaften. So spielt sie unter anderem bei der Etablierung der oralen Toleranz (Callery et al., 1989, Yang et al., 1994) oder bei der Toleranz gegenüber Organtransplantaten eine zentrale Rolle. Calne et al. konnte bereits 1969 in Tierversuchen zeigen, dass Lebertransplantate von Spendern mit inkompatiblen Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) toleriert werden, während andere Organe, wie z.B. Niere und Haut, abgestoßen wurden. Wurden diese Organe aber sekundär, das heißt nach einer bereits erfolgten Lebertransplantation desselben Spenders transplantiert, zeigte sich eine deutlich bessere Toleranz als ohne eine vorher erfolgte Lebertransplantation (Calne RY, 1969).

Diese hepatische Immuntoleranz sowie die regulatorischen Einflüsse auf die angeborene und adaptive Immunantwort werden vor allem von den Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) der Leber, wie z.B. sinusoidalen Endothelzellen (LSECs), Kupffer Zellen (KCs) und Dendritischen Zellen (DCs), durch Produktion anti-entzündlicher Zytokine (z.B. IL-10, TGF- β und Prostaglandine) und tolerogene Stimulation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen vermittelt (Thomson and Knolle, 2010).

Auf der einen Seite schützt das tolerogene Lebermilieu die Leber vor den Schäden eines zu stark aktivierten Immunsystems. Auf der anderen Seite bietet es aber auch bestimmten Pathogenen wie z.B. hepatotropen Viren und Tumorzellen ideale Bedingungen für Persistenz, Vermehrung und Wachstum.

2.2 Mikroanatomischer Aufbau der Leber

Betrachtet man den mikroanatomischen Aufbau der Leber, so wird deutlich, dass dieser mitentscheidend für die Erfüllung der metabolischen und immunologischen Aufgaben der Leber ist.

Hepatozyten, die parenchymbildenden Zellen der Leber, machen nur etwa 67 % der gesamten Leberzellen aus. Die restlichen 33 % werden von den nicht-parenchymatösen Zellen der Leber wie LSECs, DCs, KCs und Ito- bzw. Sternzellen, den Gallengangsepithelzellen (Cholangiozyten) und den intrahepatischen Lymphozyten gebildet (Racanelli and Rehermann, 2006).

Als kleinste funktionelle Einheit dienen die meist sechseckigen Zentralvenenläppchen (Lobuli hepatis), bestehend aus mehreren Portalfeldern (je mit einem Ast der V. interlobularis (Pfortaderast), der A. interlobularis (Ast der A. hepatica propria) und des Ductus biliferi interlobulares (interlobulärer Gallengang) und einer zentralen Vene (V. centralis, vgl. Abbildung 1). Die Verbindung zwischen Portalfeldern und Zentralvene bilden die radiär ausgerichteten Sinusoide, welche von den LSECs ausgekleidet werden (Aumüller, 2020).

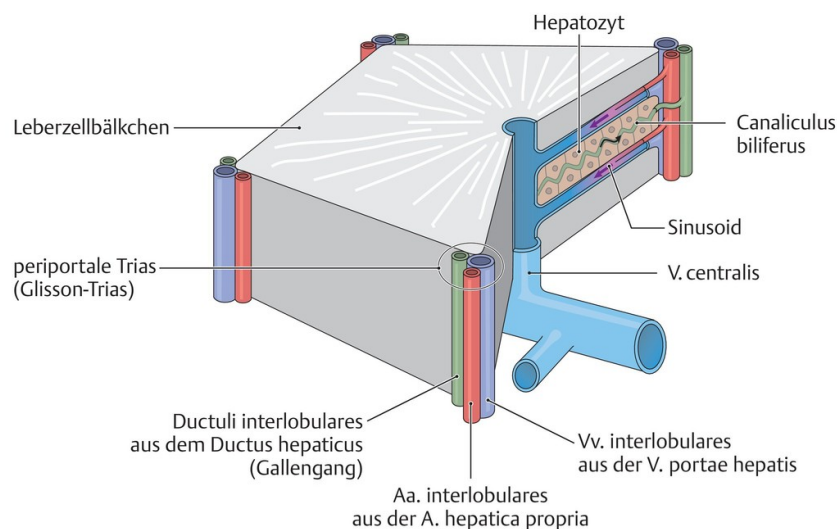


Abbildung 1: Strukturmodell eines Zentralvenenläppchens (Lobulus hepatis).

Quelle: Kirsch J. Leber (Hepar). In: Aumüller G, Aust G, Conrad A, et al., Hrsg. Duale Reihe Anatomie a., aktualisierte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2017.

Diese spezialisierten Endothelzellen bilden eine Barriere zwischen dem Blutfluss und dem darunterliegenden Dissé Raum mit den Ito- bzw. Sternzellen und den angrenzenden Hepatozyten. Eine Fenestrierung der LSECs ermöglicht den Stoffaustausch zwischen Blut und Dissé Raum sowie den direkten Kontakt zwischen Lymphozyten und den Mikrovilli der Hepatozyten bzw. zwischen Lymphozyten und Ito – Zellen. In den Sinusoiden mischt sich das nährstoff- und antigenreiche jedoch sauerstoffarme venöse mit dem sauerstoffreichen arteriellen Blut und fließt vom Portalfeld in Richtung Zentralvene. Die starke Verzweigung in die kleinkalibrigen Sinusoiden zusammen mit der Zunahme des Gesamtgefäßdurchmessers führen zu einem langsamen, zum Teil statischen Blutfluss und ermöglichen so eine direkte Interaktion zwischen Lymphozyten und den Leberzellen (Thomson and Knolle, 2010).

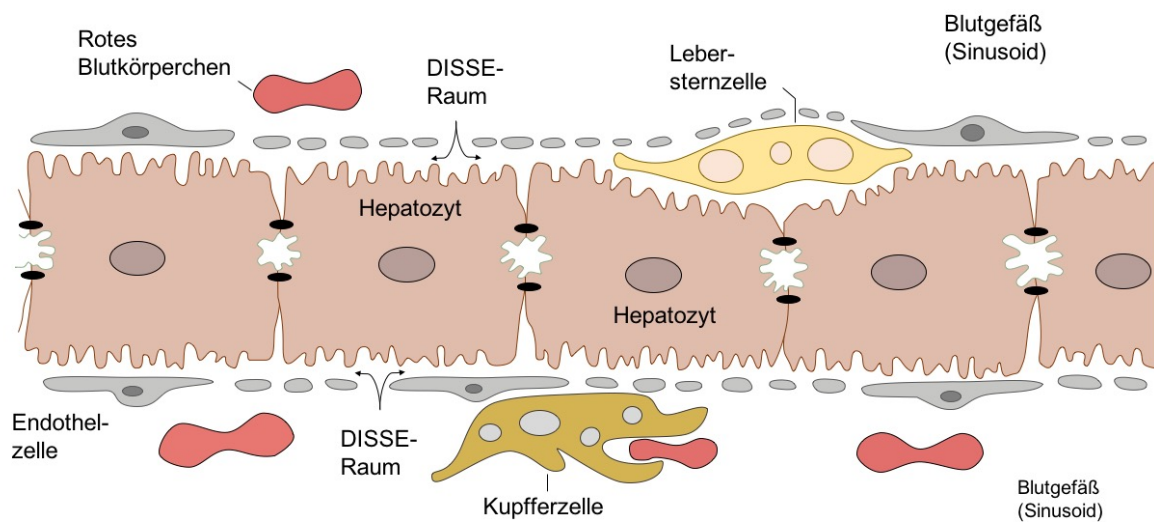


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Lebersinusoid.

Modifiziert nach: R. Lüllmann-Rauch, Taschenlehrbuch Histologie, 4. Auflage, Thieme 2012.

2.3 Antigen-präsentierende Zellen der Leber

2.3.1 Hepatozyten

Hepatozyten bilden den größten Anteil der Leberzellen. Sie übernehmen den Großteil der Stoffwechsel- und Entgiftungsfunktion, produzieren aber auch Gallensäuren und Gerinnungsfaktoren. Durch die Produktion von Akute-Phase-Proteinen wie das C-reaktive Protein (CRP) und das Alpha1-Antitrypsin sowie von Komplementfaktoren sind sie von besonderer Bedeutung für die unspezifische, angeborene Immunantwort (Crispe, 2016). Bezüglich der Bedeutung für die adaptive Immunantwort konnte gezeigt werden, dass durch die Fenestrierung des Endothels ein direkter Kontakt zwischen den Mikrovilli der Hepatozyten und den Filopodien zirkulierender T-Zellen, und damit eine direkte Hepatozyt – T-Zell Interaktion, möglich ist (Warren et al., 2006). Trotz einer vergleichsweise geringen Konzentration an MHC I Molekülen sind Hepatozyten in vitro in der Lage naive CD8⁺ T-Zellen zu aktivieren und ihre Proliferation zu induzieren. Dabei schaffen sie es allerdings aufgrund fehlender ko-stimulatorischer Signale nicht, die aktivierten Zellen am Leben zu erhalten. Dadurch wird eine zytotoxische Immunantwort verhindert und so die Etablierung einer antigenspezifischen Toleranz unterstützt (Bertolino et al., 1998, Holz et al., 2008). Unter physiologischen Bedingungen exprimieren Hepatozyten keine MHC II Moleküle auf ihrer Zelloberfläche. Interessanterweise wurde jedoch beobachtet, dass sie im Falle einer viralen Infektion, wie z.B. einer akuten Hepatitis B, sehr wohl in der Lage sind MHC II zu exprimieren (Dienes et al., 1987, Franco et al., 1988). Herkel et al. konnten zeigen, dass Hepatozyten, die MHC II Moleküle exprimieren, als APCs fungieren, welche Antigene prozessieren und CD4⁺-T-Zellen stimulieren können (Herkele et al., 2003). In diesem Fall induzierten die Hepatozyten in vitro die Differenzierung von CD4⁺-T-Zellen in T_H2 - Zellen und supprimierten die Effektorfunktion von bereits differenzierten T_H1 – Zellen. In vivo scheint jedoch vor allem die reduzierte Interferon- γ (INF- γ) Antwort der T-Zellen im Vordergrund zu stehen. Dadurch scheinen Hepatozyten unter proinflammatorischen Bedingungen in der Lage zu sein, die hepatische Immunantwort zu modellieren (Wiegard et al., 2007).

2.3.2 Dendritische Zellen (DC)

Die myeloiden und plasmazytoiden dendritischen Zellen der Leber spielen eine wichtige Rolle, nicht nur in der Regulation der angeborenen, sondern auch der adaptiven Immunität in der Leber. Sie befinden sich vor allem in der Periportalregion und haben einen überwiegend unreifen Phänotyp.

Verglichen mit DCs aus lymphoiden Geweben wie der Milz exprimieren leberständige DCs geringere Mengen an MHC II und ko-stimulatorischen Molekülen. Des Weiteren produzieren sie nach Toll-like Rezeptor-Stimulation geringere Mengen an Interleukin (IL) 12 und produzieren vorwiegend IL-10 und IL-27. Das tolerogene Zytokinmilieu der Leber (TGF- β und IL-10) scheint dabei den tolerogenen Phänotyp der DCs zu fördern (Thomson and Knolle, 2010).

Leber-DCs sind nach bereits stattgefundenener LPS-Stimulation vorübergehend hyposensibel gegenüber einer erneuten Stimulation mit LPS. Diese Eigenschaft ist auch als LPS-Toleranz bekannt (Biswas and Lopez-Collazo, 2009). Des Weiteren sind sie in der Lage, eine entzündungsfördernde T_H1 -Antwort zu unterdrücken, während sie eine T_H2 -Antwort fördern (De Creus et al., 2005, Khanna et al., 2000) und scheinen die Bildung von $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T_{Reg} s zu induzieren (Jinushi et al., 2007). Ruhende DCs inhibieren außerdem die Proliferation und die Zytokinproduktion von aktivierten gewebeinfiltrierenden Effektor T-Zellen (Probst et al., 2005). Trotz ihrer geringen Anzahl wird vor allem den unreifen DCs eine wichtige Rolle bei der Transplantattoleranz zugeschrieben (Thomson and Lu, 1999).

2.3.3 Ito- Zellen

Ito-Zellen oder auch hepatische Sternzellen machen weniger als 1 % aller nicht-parenchymatösen Zellen in der Leber aus. Sie befinden sich im Dissé Raum, speichern Vitamin A und differenzieren sich unter entzündlichen Bedingungen zu Myofibroblasten. Diese wiederum produzieren extrazelluläre Matrix, was bei chronischen Lebererkrankungen einen zentralen Pathomechanismus in der Entwicklung einer Leberfibrose darstellt (Carambia and Herkel, 2010, Thomson and Knolle, 2010). Es konnte gezeigt werden, dass Ito-Zellen in der Lage sind, über MHC Klasse I und II sowie ko-stimulatorische Moleküle wie CD86 $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen sowie Natürliche Killer T Zellen (NKT) zu aktivieren (Winau et al., 2007).

Studien zeigen, dass aktivierte Ito – Zellen von Mäusen die adaptive Immunantwort durch die Induktion von T-Zell-Apoptose (Yu et al., 2004) und klonale Expansion von T_{Reg} s (Jiang et al., 2008) reduzieren können.

2.3.4 Kupffer Zellen (KC)

Die Kupffer Zellen sind die größte Population organständiger Makrophagen im gesamten Organismus und bilden mit ca. 20 %, nach den sinusoidalen Endothelzellen, die zweitgrößte Population an APCs in der Leber.

Sie befinden sich vorwiegend in den periportalen Bereichen der Sinusoide und produzieren unter proinflammatorischen Bedingungen entzündungsfördernde Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-12 und Tumor Nekrose Faktor- α (TNF α). Hier können sie sich nicht nur an der Beseitigung von Endotoxinen, apoptotischen Zellen und Mikroorganismen beteiligen, sondern auch mit zirkulierenden natürlichen Killerzellen (NK), NKT und T-Zellen in Kontakt kommen (Thomson and Knolle, 2010, Carambia and Herkel, 2010).

KCs exprimieren in geringem Umfang MHC II und ko-stimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 und sind damit befähigt, CD4⁺ T-Zellen Antigene zu präsentieren (You et al., 2008).

Generell spielen KCs eine wichtige Rolle als tolerogene APCs. Durch von ihnen produzierte Prostaglandine ist es ihnen möglich, eine antigenspezifische CD4⁺ T-Zell Antwort zu unterdrücken (You et al., 2008). Des Weiteren bilden KCs das antiinflammatorische Zytokin IL-10. Als Reaktion auf die Stimulation mit LPS sezernieren KCs neben entzündungsfördernden Zytokinen auch signifikante Mengen an entzündungshemmendem IL-10 und Transforming growth factor beta (TGF- β). Unter physiologischen Bedingungen sind sie in der Lage, T_{Regs} zur Produktion von IL-10 zu stimulieren, wodurch die entzündungshemmende Wirkung dieser Zellen gefördert wird. Werden KCs selber mit IL-10 stimuliert, können sie die Freisetzung von proinflammatorischem IL-6 und TNF α herabregulieren (Knoll et al., 1995, Breous et al., 2009).

Trotz ihrer vielfältigen toleranzfördernden Fähigkeiten sind KCs im Falle einer Leberinfektion wichtige APCs. Sie sind in der Lage, CD8⁺ T-Zellen mittels Kreuz-Präsentation parasitäre Antigene zu präsentieren und mit bakteriellen Antigenen über ihre CD1d Moleküle NKT Zellen zu aktivieren (Beattie et al., 2010, Lee et al., 2010).

Alles in allem scheinen Kupffer-Zellen an der Toleranzentwicklung gegenüber zirkulierenden und lokalen Antigenen beteiligt zu sein. Allerdings sind sie bei mikrobiellen Infektionen auch in der Lage, eine lokale Immunität zu unterstützen (Thomson and Knolle, 2010).

2.3.5 Sinusoidale Endothelzellen der Leber (LSEC)

LSECs bilden mit ca. 50 % den größten prozentualen Anteil der Nicht-parenchymalen Zellen (NPC) der Leber (Racanelli and Rehermann, 2006). Als Barriere zwischen Blutfluss und Dissé Raum mit den angrenzenden Hepatozyten, bilden sie ein hoch spezialisiertes fenestriertes Endothel (Warren et al., 2006), welches Ähnlichkeiten zu lymphatischem Endothel aufweist. Ihre herausragende Endozytosefähigkeit bildet die Grundlage für viele ihrer immunregulatorischen Funktionen.

Zusätzlich sorgt der langsame Blutfluss im Sinusoid (s.o.) dafür, dass zirkulierende Immunzellen wie z.B. NKT Zellen und Lymphozyten mit den Leberzellen ausgiebig interagieren können (Knolle and Wohlleber, 2016).

LSECs scheinen sowohl in der Regulation der angeborenen Immunantwort, als auch in der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellantwort eine wichtige Rolle zu spielen. Im Folgenden wird die immunologische Funktion von LSECs ausführlicher beschrieben, da diese im Fokus dieser Arbeit stand.

2.3.5.1 Bedeutung von LSECs für die angeborene Immunantwort

Teil der angeborenen Immunantwort ist die sogenannte Akute-Phase-Reaktion. Sie bezeichnet im Allgemeinen die Frühphase einer Entzündungsreaktion als Antwort des Körpers auf eine Verletzung, ein Trauma oder eine Infektion. Sie geht mit der Produktion von sogenannten Akute-Phase-Proteinen, wie z.B. dem C-reaktiven Protein (CRP) einher, welche vor allem in der Leber produziert werden (Baumann and Gauldie, 1994).

LSECs zeigen die höchste Endozytoserate aller Zellen des Organismus (Knolle and Wohlleber, 2016). Sie exprimieren verschiedene Scavenger-Rezeptoren und den Mannose-Rezeptor und sind so in der Lage, eine Vielzahl unterschiedlicher Moleküle aus dem Blut zu binden. Zusätzlich wurden auf ihrer Plasmamembran viele Pattern recognition Rezeptoren (PRR) inklusive Toll-like Rezeptoren (TLR) nachgewiesen. Diese Rezeptorkombination macht sie zu idealen Zellen, um die Sinusoide auf das Vorhandensein von potentiell infektiösen Pathogenen zu überprüfen. Binden Pathogen associated patterns (PAMPs), das sind Pathogen-spezifische Moleküle wie z.B. Zellmembranbestandteile oder virale DNA, an die PRRs, sezernieren LSECs das proinflammatorische Zytokin IL-6 (Knolle and Wohlleber, 2016). IL-6 aktiviert Hepatozyten und sorgt für eine Sekretion von CRP und anderen Komplementfaktoren (Baumann and Gauldie, 1994).

Über diesen Mechanismus scheinen LSECs an der Aktivierung der angeborenen Immunität beteiligt zu sein (Knolle and Wohlleber, 2016).

2.3.5.2 Bedeutung von LSECs für die hepatische LPS-Toleranz

Endothel- und Kupffer-Zellen sind die ersten Zellpopulationen des Lebersinusoids, die mit bakteriellen Antigenen in Kontakt kommen. Werden LSECs mit TLR-Liganden wie LPS stimuliert, produzieren sie dosisabhängig entzündungsfördernde Zytokine wie IL-6. Dazu sind bereits geringste Konzentrationen (< 100 pg/ml) ausreichend.

Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die LPS-abhängige IL-6 Produktion der LSECs von antiinflammatorischem IL-4 und IL-10, welches von LPS-stimulierten KCs sezerniert wird, ebenfalls dosisabhängig inhibiert werden kann (Knolle et al., 1997).

Eine wiederholte LPS-Exposition führt zusätzlich zu einer deutlich geringeren oder gar fehlenden IL-6 Antwort der LSECs. In *in vitro* Versuchen mit reinen LSEC-Kulturen war zu sehen, dass LSECs ihre Sensibilität gegenüber LPS autonom kontrollieren können.

Wie bei Monozyten / Makrophagen geht diese LPS-Toleranz mit einer reduzierten Translokation von Nuclear factor- κ B (NF- κ B) in den Zellkern einher. Allerdings zeigen LPS-tolerante LSECs keine Herabregulierung des TLR4-Rezeptors. Auch die Scavenger-Aktivität der LSECs scheint derweil unabhängig von einer bereits stattgefundenen LPS-Stimulation zu sein, wodurch eine konstante Endozytosefunktion gewährleistet zu sein scheint (Uhrig et al., 2005).

LPS-tolerante LSECs zeichnen sich im Vergleich zu naiven LSECs durch eine fehlende Expressionserhöhung des Oberflächenmoleküls CD54 aus. Zusätzlich zeigten LPS-tolerante LSECs, im Sinne einer Kreuz-Resistenz, auch bei der Stimulation mit entzündungsfördernden Zytokinen wie Interferon- γ (INF- γ) und TNF α eine fehlende CD54-Expressionserhöhung (Uhrig et al., 2005). Da CD54 für die Leukozytenadhäsion von essentieller Bedeutung ist (Wong et al., 1997), scheinen LPS-tolerante LSECs so *in vitro* und *in vivo* in der Lage zu sein, eine übermäßige Leukozytenadhäsion und die damit einhergehende Immunantwort aufgrund eines konstant wiederkehrenden LPS-Stimulus zu verhindern. Hohe LPS-Konzentrationen (10 x höher als die Primärstimulation) konnten die LPS-Toleranz in LSECs überwinden. So ist anzunehmen, dass LPS-tolerante LSECs bei physiologisch vorkommenden LPS-Konzentrationen einen essenziellen Bestandteil bei der Etablierung und Aufrechterhaltung des tolerogenen Lebermilieus darstellen. Durch die Überwindung dieser Toleranz, z.B. bei erhöhten LPS-Konzentrationen während einer bakteriellen Infektion, ist es ihnen dennoch möglich, eine Immunantwort zu fördern (Uhrig et al., 2005).

2.3.5.3 LSECs inhibieren CD4⁺ T-Zell-Aktivität

Zusätzlich zu Scavenger Rezeptoren und PRRs exprimieren LSECs das „Liver Sinusoidal Endothelial Cell Lectin“ (LSECTin). Hierbei handelt es sich um einen Lectin-Rezeptor vom Typ C (Liu et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass CD44, ein Oberflächenmolekül auf aktivierten CD4⁺ T-Zellen, ein endogener Ligand des LSECTin ist. Bindet CD44 an LSECTin führt das zu einer Hemmung des T-Zell-Rezeptor (TCR) - Signalings und damit zu einer reduzierten Aktivität, Proliferation und Effektorfunktion der T-Zelle. In *in vivo* Experimenten mit LSECTin knock-out Mäusen zeigte sich im Modell der Concanavalin A (ConA) induzierten akuten Leberentzündung ein deutlich stärkerer Schaden (Tang et al., 2009). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass LSECs in der Lage sind die proinflammatorische CD4⁺ T_H1 und T_H17 Antwort effektiv zu inhibieren. Carambia et al. konnten zeigen, dass die Stimulation von T_H1- und T_H17-Zellen durch LSECs die Sekretion von IFN γ und IL-17 drastisch reduzierte. Fehlten hemmende Signale, wie antiinflammatorisches IL-10 oder der inhibierende „programmed Cell death protein -1“ (PD-1) Rezeptor, waren LSECs nicht mehr in der Lage, die Freisetzung der entzündungsfördernden Zytokine zu verhindern (Carambia et al., 2013).

Alles in allem scheinen LSECs in der Lage zu sein, die Effektorfunktion von aktivierten CD4⁺ T-Zellen auf verschiedene Weise zu reduzieren.

2.3.5.4 LSEC-induzierte regulatorische T-Zellen vermitteln antigenspezifische intra- und extrahepatische Toleranz

LSECs exprimieren geringe Mengen an MHC I und II sowie der kostimulatorischen Faktoren CD80 und CD86 (Lohse et al., 1996). Hierdurch sind sie in der Lage Antigene zu präsentieren und CD4⁺ T-Zellen zu aktivieren. Durch eine fehlende IL-12-Expression sind sie jedoch nicht in der Lage die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu CD4⁺ T_H1-Zellen zu induzieren (Knolle et al., 1999b). Interessanterweise führt die Aktivierung von naiven CD4⁺ T-Zellen dazu, dass sich die Zellen zu regulatorischen T-Zellen differenzieren. Bei Kruse et al. zeigten LSEC-aktivierte CD4⁺ T-Zellen eine Differenzierung in CD4⁺ CD25^{low} FoxP3⁻ T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften. Diesen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* suppressiven Zellen fehlte eine Effektorzell-typische Zytokinproduktion, z.B. von IFN γ (Kruse et al., 2009).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass LSECs, im Vergleich mit anderen Leber-residenten APCs, am effektivsten in der Lage sind, antigenspezifische $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T-regulatorische Zellen (T_{Regs}) zu induzieren. Diese LSEC-induzierten T_{Regs} waren *in vitro* in der Lage, sowohl die Proliferation, als auch die IFN- γ Produktion von $CD4^+$ Effektor-T-Zellen zu hemmen. *In vivo* konnten LSEC-induzierte antigenspezifische T_{Regs} in einem Tiermodell der Multiplen Sklerose (Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis / EAE) die Tiere vor der Entwicklung einer EAE bewahren (Carambia et al., 2014, Carambia et al., 2015).

Insgesamt scheinen LSECs eine wichtige Rolle bei der Entstehung von peripheren T_{Regs} und somit in der Etablierung von antigenspezifischer Immuntoleranz zu spielen.

2.3.5.5 LSECs verhindern die antigenspezifische Aktivierung von $CD8^+$ T-Zellen in der Leber

Wird einer naiven $CD8^+$ T-Zelle von einer APC, wie z.B. einer DC, ein passendes Antigen über ihren MHC I präsentiert und stehen die nötigen ko-stimulatorischen Signale (z.B. CD80, CD86 und IL-12) zur Verfügung, wird die $CD8^+$ T-Zelle zu einer zytotoxischen T-Zelle aktiviert. Besteht jedoch ein direkter physischer Kontakt zwischen LSECs und den Antigen-präsentierenden DCs sind die LSECs in *in vitro* Experimenten in der Lage diese Aktivierung zu verhindern. Auch wenn der Mechanismus bisher nicht abschließend geklärt ist, konnte eine Reduktion der ko-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf der Oberfläche sowie eine reduzierte IL-12 Produktion nach LPS-Stimulation bei mit LSECs ko-kultivierten DCs beobachtet werden (Schildberg et al., 2008).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass LSECs naive $CD8^+$ T-Zellen direkt beeinflussen können. Werden naive $CD8^+$ T-Zellen Antigene von LSECs über ihre MHC I Moleküle präsentiert, kommt es zu einer Interaktion zwischen MHC I der LSECs und dem TCR der T-Zelle. Diese Interaktion führt zur Aktivierung beider Zellen, die mit einer erhöhten Expression von MHC I und PD-L1 auf LSECs und PD1 auf $CD8^+$ T-Zellen einhergeht. Die Interaktion von PD1 und seinem Liganden führt anschließend zu einer Toleranzinduktion in der $CD8^+$ T-Zelle. In diesem toleranten Status sind die T-Zellen unempfindlich für eine Stimulation über den TCR und somit nicht in der Lage, eine Effektorfunktion auszuüben (Diehl et al., 2008).

LSECs scheinen neben der oben beschriebenen Fähigkeit zur Induktion von $CD4^+$ T Zell-Toleranz auch einen wichtigen Beitrag bei der Entstehung von $CD8^+$ T-Zell-Toleranz zu leisten (Knolle and Wohlleber, 2016).

2.3.5.6 Kreuz-Präsentation von Antigenen durch LSECs ist ein wichtiger Bestandteil in der Regulation der CD8⁺ T-Zell Immunreaktion.

LSECs sind, wie einige andere Zellpopulationen (z.B. bestimmte DCs, B-Zellen), in der Lage, lösliche Antigene mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose aufzunehmen und auf ihren MHC I Molekülen CD8⁺ T-Zellen zu präsentieren. Dieser, als Kreuz-Präsentation bezeichneter, Mechanismus spielt eine wichtige Rolle bei der LSECs-abhängigen Regulation der Immunantwort von CD8⁺ T-Zellen (Knolle and Wohlleber, 2016).

Da die Kreuz-Präsentation für CD8⁺ T-Zellen, und damit auch das TCR-Signaling, mit steigenden Antigenkonzentrationen quasi linear ansteigt, die Expression des PD-L1 jedoch ein Plateau erreicht, führt dies zu einem Ungleichgewicht zugunsten des TCR-Signaling. Es konnte gezeigt werden, dass sich die T-Zellen in dieser Situation, IL-12-abhängig zu CD8⁺ Effektor-T-Zellen differenzieren (Schurich et al., 2010).

Diese Beobachtung zeigt, dass LSECs bei hohen Antigenkonzentrationen die Differenzierung von naiven CD8⁺ T-Zellen in Effektor-T-Zellen unterstützen und sich so an einer lokalen Pathogen-spezifischen Immunantwort beteiligen können (Knolle and Wohlleber, 2016).

Während teilaktivierte naive CD8⁺ T-Zellen normalerweise eliminiert werden, zeigen CD8⁺ T-Zellen, die unter nicht entzündlichen Bedingungen von kreuz-präsentierenden LSECs aktiviert werden, eine Proliferation zu einer Art Gedächtnis-T-Zellen. Sie sind in der Lage, nach ihrer Aktivierung in der Leber in die T-Zell-Zonen von sekundären lymphatischen Organen zu migrieren und wie professionelle Gedächtnis-T-Zellen eine lange Zeit ohne Antigenpräsentation zu überleben (Knolle and Wohlleber, 2016). Es konnte gezeigt werden, dass diese LSEC-stimulierten Gedächtnis-T-Zellen nur durch aktivierte DCs reaktiviert werden können. Damit können sie nur im Falle einer mikrobiellen Infektion proliferieren und ihre Effektorfunktion zurückerlangen (Böttcher et al., 2013).

Die Kreuz-Präsentation von Antigenen durch LSECs führt jedoch nicht ausschließlich zu einer Toleranz. LSECs sind befähigt, virale Antigene von virusinfizierten Hepatozyten mittels Kreuz-Präsentation antigenspezifischen CD8⁺ Effektor-T-Zellen zu präsentieren. Werden die CD8⁺ Effektor-T-Zellen von LSECs aktiviert, treiben sie die infizierten Hepatozyten mittels TNF in die Apoptose (Wohlleber et al., 2012).

Die Kreuz-Präsentation scheint so ein bedeutender Mechanismus in der Regulation der CD8⁺ T-Zell Immunreaktion zu sein.

2.4 Der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor

Der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (Ahr) ist ein Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor und gehört zur Familie der Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren. Ursprünglich als Rezeptor für das Umwelttoxin 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) entdeckt, erlaubt seine polymorphe Bindungsstelle auch die Interaktion mit vielen unterschiedlichen Liganden, wie z.B. Nahrungsmetaboliten (Tryptophanderivate) und natürlich vorkommenden Flavonoiden. Studien mit Ahr Knock-out Mäusen (Ahr^{-/-}) sowie der Umstand, dass der Rezeptor ein hoch konserviertes Molekül in verschiedenen Organismen darstellt, zeigen, dass der Ahr auch wichtige physiologische Funktionen besitzt. Neben der Regulation diverser toxikologischer Metabolisierungsprozesse scheint der Ahr eine zentrale Rolle in der embryonalen Entwicklung und in der Regulation des angeborenen und adaptiven Immunsystems zu spielen (Nguyen and Bradfield, 2008, Quintana and Sherr, 2013).

2.5 Ahr-Signalwege

Im inaktiven Zustand liegt der Ahr als Teil eines Proteinkomplexes zusammen mit dem Chaperon heat shock protein 90 (Hsp90), der Tyrosinkinase SRC (c-SRC) sowie dem Ahr-assoziierten Protein 9 (Ara9) im Zytosol der Zelle vor.

Das Binden eines Liganden führt beim genomischen Ahr-Signalweg zum Zerfall dieses Proteinkomplexes und zur Translokation des Ahr in den Zellkern. Im Zellkern kommt es zu einer Interaktion zwischen Ahr und dem Ahr nuclear translocator (Arnt) sowie weiteren Transkriptionsfaktoren und aktivierenden Proteinen. Dieser Proteinkomplex bindet nun an spezielle Sequenzen der Zielgene (Dioxin responsive elements, DRE) und ist so in der Lage, deren Transkription zu beeinflussen. Zusätzlich interagiert der Ahr mit anderen Transkriptionsfaktoren, deren Funktionen im Immunsystem bereits gut untersucht sind (z.B. c-Maf, STAT, Östrogen-Rezeptor oder Retinolsäure-Rezeptor). Interessanterweise kommen einige dieser Interaktionen nur bei bestimmten Ahr-Liganden zustande, was zu der Annahme führt, dass die Assoziation mit einigen Transkriptionsfaktoren, und die davon abhängige Regulation der Zielgene, ligandenabhängig zu sein scheint (Quintana and Sherr, 2013).

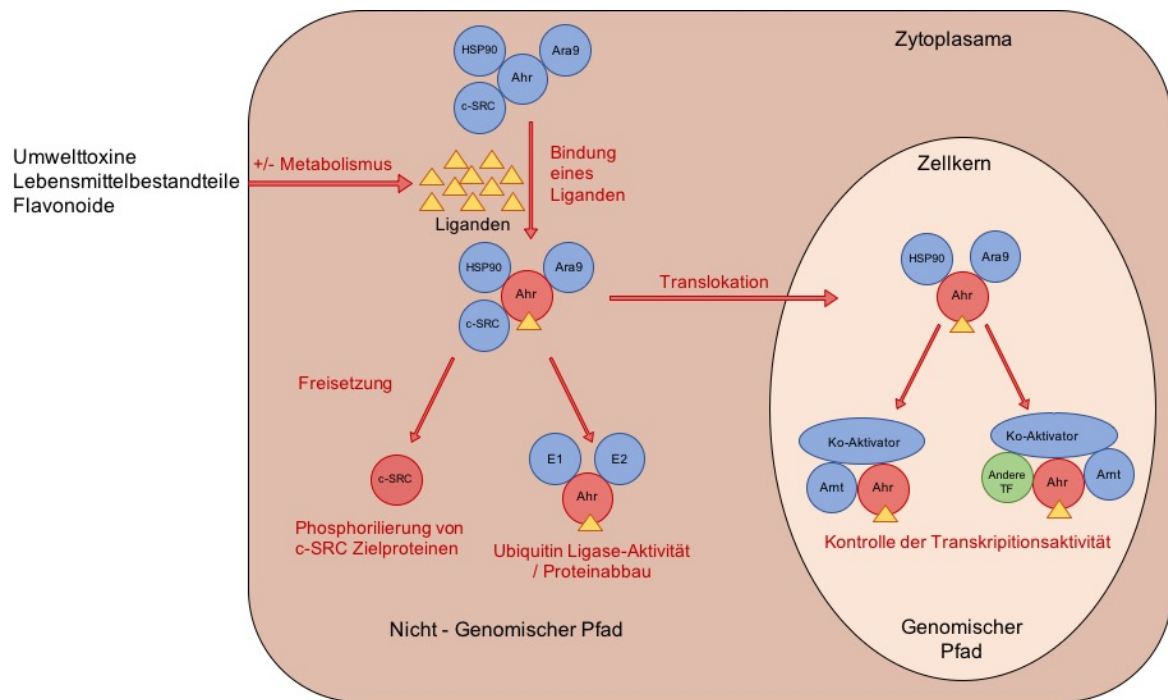


Abbildung 3: Übersicht über die Ahr-Signalwege.
 Nach (Quintana and Sherr, 2013).

Im Gegensatz zum genomischen Pfad, verbleiben beim nicht-genomischen Pfad sowohl der Ahr als auch die anderen Bestandteile des Proteinkomplexes im Zytoplasma. Dabei führt die Bindung eines Liganden zum einen zur Freisetzung der c-SRC (Matsumura, 2009), welche dann durch Phosphorylierung verschiedener Targetproteine eine Vielzahl an Zellfunktionen beeinflussen kann. Zum anderen konnte nachgewiesen werden, dass der Ahr über eine ligandenabhängige E3 Ubiquitin Ligase-Aktivität den Abbau von spezifischen Transkriptionsfaktoren im Proteasom regulieren kann (Ohtake et al., 2007). Allerdings ist bisher nicht eindeutig geklärt, ob diese alternativen Signalwege für die immunologische Funktion des Ahr von relevanter Bedeutung sind.

2.6 Die Rolle des Ahr in angeborenen und adaptiven Immunantworten

Der Ahr spielt eine wichtige Rolle in der Regulation adaptiver Immunantworten. Es konnte gezeigt werden, dass der Ahr die Differenzierung und Aktivität von regulatorischen T-Zellen und T_H17-Zellen beeinflusst. Des Weiteren scheint der Ahr auch an der Kontrolle der APC- / T-Zell-Interaktionen und an angeborenen Immunantworten beteiligt zu sein (Quintana and Sherr, 2013).

2.6.1 Ahr in regulatorischen T-Zellen

2.6.1.1 T_{Regs}

CD4⁺ FoxP3⁺ T_{Regs} sind ein wichtiger Baustein in der Kontrolle adaptiver Immunantworten sowie von Autoimmunität. Für die Differenzierung und Funktion von T_{Regs} ist der Transkriptionsfaktor FoxP3 essenziell (Fontenot et al., 2003, Hori et al., 2003). Die Aktivierung des Ahr mit seinem Agonisten TCDD führte in vivo zu einer Induktion von T_{Regs}. Diese T_{Regs} waren anschließend in der Lage, die Immunantwort von CD4⁺ Effektor-T-Zellen im EAE Modell TGF- β -abhängig zu inhibieren (Quintana et al., 2008). Mechanistisch scheint der Ahr sowohl die Expression von FoxP3 zu induzieren (Quintana et al., 2008), als auch mit Transkriptionsfaktoren zu interagieren, die die Expression von FoxP3 beeinflussen. In Mäusen hemmt Ahr den Transkriptionsfaktor STAT1, welcher die Differenzierung von FoxP3⁺ T_{Regs} hemmt (Quintana et al., 2010). Zusätzlich ist der Ahr in der Lage die Expression von Transkriptionsfaktoren der Ikaros-Familie zu regulieren. Die Kombination von FoxP3 und Aiolos (Transkriptionsfaktor der Ikaros-Familie) führt in T_{Regs} zur Abschaltung der IL-2-Expression. Da IL-2 mit einer Effektor-T-Zell Funktion assoziiert ist, scheint Ahr sowohl an der Induktion T_{Reg}-spezifischer Gene, als auch an der Inhibierung einer Effektor-T-Zell-Funktion beteiligt zu sein (Quintana and Sherr, 2013).

2.6.1.2 Typ 1 regulatorische T-Zellen (T_R1)

Als T_R1 Zellen werden FoxP3⁻ IL-10⁺ CD4⁺ regulatorische T-Zellen bezeichnet, die sich durch die Produktion von hohen Konzentrationen IL-10 sowie TGF- β auszeichnen. Dadurch sind sie in der Lage, die antigenspezifische Effektorfunktion von CD4⁺ T-Zellen zu unterdrücken und so an der Regulation der adaptiven Immunantwort teilzunehmen. T_R1 Zellen lassen sich von T_H1 und T_H2 Zellen durch ihre geringe Produktion von IL-2 und das Fehlen einer IL-4 Produktion abgrenzen (Roncarolo et al.).

Mehrere *in vitro* Studien konnten die Bedeutung von IL-27 für die Differenzierung von T_{R1} - Zellen belegen (Quintana and Sherr, 2013). Es konnte gezeigt werden, dass Ahr die Differenzierung von T_{R1} Zellen an mehreren Stellen reguliert. Während eine Reduktion des Ahr *in vivo* zu einer reduzierten Differenzierung von T_{R1} Zellen führt, zeigt die Aktivierung des Rezeptors *in vitro* eine gesteigerte T_{R1} -Differenzierung (Apetoh et al., 2010). Des Weiteren konnten verschiedene Interaktionen zwischen Ahr und anderen Transkriptionsfaktoren wie c-Maf und STAT-3 ausgemacht werden, die die Differenzierung und Aktivität von T_{R1} Zellen regulieren (Quintana and Sherr, 2013). Zum Beispiel interagiert Ahr mit c-Maf, welcher ein universaler Transkriptionsfaktor für die Kontrolle der IL-10 Produktion in den verschiedenen Immunzellen zu sein scheint (Saraiva and O'Garra, 2010), um den IL-10 Promoter zu transaktivieren. Zusätzlich ist der Ahr / c-Maf Komplex in der Lage den IL-21 Promoter zu binden und zu transaktivieren. IL-21 unterstützt autokrin die IL-10 Produktion, Expansion und Stabilität von T_{R1} Zellen (Apetoh et al., 2010).

2.6.2 Ahr in T_H17 Zellen

T_H17 Zellen sind zentrale Bestandteile in der Pathogenese diverser Autoimmunerkrankungen wie z.B. Psoriasis, Rheumatoide Arthritis, Systemischer Lupus erythematoses und Multiple Sklerose (MS). Sie differenzieren sich unter Einfluss von TGF- β und IL-6 aus $CD4^+$ T-Zellen und produzieren proinflammatorische Zytokine wie IL-17, IL-21 und IL-22. (Baricza et al., 2016).

Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Ahr eine wichtige Rolle in verschiedenen Stadien der T_H17 -Differenzierung spielt. Zum einen führt die Ahr-Aktivierung mit natürlichen Liganden zu einer Ahr-abhängigen Reduktion der STAT5-vermittelten Inhibierung der frühen T_H17 -Differenzierung (Veldhoen et al., 2009, Kimura et al., 2008). Zum anderen scheint Ahr die Expression der Zytokine IL-21 und IL-22 zu beeinflussen. *In vitro* führt Ahr-Aktivierung zu einer gesteigerten T_H17 Zell-Differenzierung und IL-21 und IL-22 Produktion. Ahr-defiziente Mäuse zeigen hingegen eine gehemmte T_H17 Zell-Differenzierung und sind nach Zugabe von Ahr-Liganden nicht in der Lage, IL-22 zu produzieren (Veldhoen et al., 2008).

2.6.3 Ahr in APCs

Der Ahr ist offensichtlich in der Lage, die Differenzierung und Aktivität von DCs zu kontrollieren. Studien über Transkriptionsvorgänge in DCs nach Stimulation führten zur Identifizierung von Transkriptionsfaktoren, die eine zentrale Rolle in der Regulation der DC-Antwort spielen, darunter NF- κ B und „Activator Protein-1“ (AP-1) (Quintana and Sherr, 2013). Ahr kann mit diesen Transkriptionsfaktoren interagieren und so ihre Aktivität und ihren Abbau regulieren (Gillesby et al., 1997, Tian et al., 1999).

Darüber hinaus hat der Ahr einen signifikanten Effekt auf die Antigenpräsentation von DCs. Die Aktivierung von Ahr führt zu einer gesteigerten Expression von MHC II und kostimulatorischen Molekülen (Vogel et al., 2008) sowie zu einer reduzierten Produktion von T_H1 und T_H17 polarisierenden Zytokinen. Des Weiteren ist Ahr in der Lage, die Induktion von $FoxP3^+$ - T_{Reg} s durch DCs zu fördern (Quintana and Sherr, 2013). Aktuell sind mindestens zwei Mechanismen bekannt:

1. Ahr-Aktivierung führt in DCs zu einer gesteigerten Expression der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), einem Enzym des Tryptophanstoffwechsels. Die IDO produziert daraufhin immunsuppressive Tryptophanmetabolite, die Kynurenine, die in der Lage sind, den Ahr in $CD4^+$ T-Zellen zu aktivieren. Durch die Aktivierung des Ahr durch Kynurenine kommt es dann zur Differenzierung zu $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T_{Reg} s. Fehlt den DCs der Ahr wird die Differenzierung von naiven $CD4^+$ T-Zellen zu T_{Reg} s supprimiert (Mezrich et al., 2010, Nguyen et al., 2010).
2. Retinolsäure (RA) unterstützt die Induktion von T_{Reg} s (Hall et al., 2011). Die Aktivierung des Ahr mit seinem Liganden ITE in DCs führte zu einer gesteigerten Expression der Dehydrogenasen, die die RA-Produktion kontrollieren. Durch die Sekretion von RA kam es zu einer gesteigerten T_{Reg} -Differenzierung durch DCs. Wurde das RA-Signaling in DCs durch einen Inhibitor unterbunden, zeigte sich eine reduzierte T_{Reg} -Induktion (Quintana et al., 2010).

2.6.4 Ahr in „innate lymphoid cells“ (ILC) und NK-Zellen

ILCs sind eine erst kürzlich entdeckte Population von Lymphozyten und werden der angeborenen Immunität zugeschrieben. Sie kommen vor allem in Schleimhäuten vor, wo sie über Zytokinrezeptor-Signaling das umgebende Mikromilieu überwachen. ILC3s scheinen eine Art angeborenes Gegenstück zu T_H17 Zellen zu sein.

Sie exprimieren hohe Konzentrationen an Ahr und es konnte gezeigt werden, dass der Ahr eine wichtige Funktion in der Entwicklung, Erhaltung und IL-22 Produktion von ILC3s besitzt. So finden sich in Ahr-defizienten Mäusen deutlich reduzierte Anzahlen an ILC3s im Dünndarm und den sich dort befindenden Peyer Plaques und das Fehlen von Ahr in ILC3s führt zu einer reduzierten IL-22 Produktion (Cella and Colonna, 2015).

Auch in NK-Zellen, dem „Prototypen“ der ILC1, scheint der Ahr wichtige Funktionen zu haben. Eine Liganden-abhängige Aktivierung des Rezeptors führt zu einer gesteigerten zytotoxischen Aktivität und IFN γ -Produktion. Ahr-defiziente Mäuse zeigen in vivo eine reduzierte NK-Zell-vermittelte anti-Tumor-Aktivität (Shin et al., 2013).

Zusätzlich zu diesen proinflammatorischen Funktionen des Ahr in NK-Zellen scheint der Ahr aber auch die Produktion von antiinflammatorischem IL-10 fördern zu können (Wagage et al., 2014).

2.7 Ahr-Liganden

Der Ahr wurde ursprünglich als Rezeptor für Dioxin und andere Umwelttoxine entdeckt. Mittlerweile sind jedoch eine Vielzahl weiterer exo- und vor allem endogener Ahr-Liganden identifiziert worden, die entweder als Agonist oder Antagonist am Ahr wirken. Da die polymorphe Bindungsstelle des Ahr mit einer Vielzahl unterschiedlicher Liganden interagieren kann, werden hier nur die Liganden und deren immunologische Einflüsse auf den Ahr besprochen, die für diese Arbeit relevant sind:

2.7.1 Exogene Liganden

Zu den exogenen Liganden des Ahr zählen vor allem Xenobiotika, wie halogenierte und polyzyklische, aromatische Kohlenwasserstoffe. Die meisten dieser Substanzen, die durch den menschlichen Einfluss (Industrie) in die Umwelt gelangen, sind mehr oder weniger starke Ahr-Agonisten. Sie wirken typischerweise karzinogen und teratogen (Baricza et al., 2016).

2.7.1.1 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)

TCDD ist der wahrscheinlich am besten untersuchte Ahr-Ligand und einer der stärksten bekannten Ahr-Agonisten. Eine Aktivierung des Ahr mit TCDD führt in Immunzellen in vivo zu einer gesteigerten Differenzierung von T_{Regs} . Diese T_{Regs} waren in der Lage, die Entwicklung einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (Quintana et al., 2008), Uveoretinitis (Zhang et al., 2010), Colitis (Benson and Shepherd, 2011) und spontanen autoimmunen Diabetes (Kerkvliet et al., 2009) im Tiermodell zu verhindern. Gleichzeitig führte TCDD zu einer Inhibierung der T_{H17} -Differenzierung (Quintana et al., 2008) sowie in vitro zu einer gesteigerten T_{R1} -Differenzierung (Apetoh et al., 2010). In DCs führte die Ahr-Aktivierung durch TCDD zur Induktion derIDO, was wiederum eine gesteigert T_{Reg} -Differenzierung induzierte (Mezrich et al., 2010).

2.7.1.2 CH-223191

Der Ahr-Antagonist CH-223191 wurde durch eine systematische Suche in einer Datenbank für synthetische Chemikalien entdeckt. Während andere bekannte Ahr-Antagonisten bei hohen Konzentrationen auch agonistische Eigenschaften zeigen oder den Östrogenrezeptor binden, scheint CH-223191 ein potenter und spezifischer Ahr-Antagonist zu sein, der in der Lage ist, vor der Ahr-vermittelten Toxizität von TCDD zu schützen (Kim et al., 2006).

In Zellkulturexperimenten führte eine Hintergrund-Ahr-Aktivierung, z.B. durch die lichtabhängige Produktion des Ahr-Agonisten FICZ dazu, dass sich naive CD4⁺ T-Zellen zu T_H17-Zellen differenzierten. Die Anwesenheit von CH-223191 behinderte diese T_H17-Differenzierung *in vitro* (Veldhoen et al., 2009). Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass CH-223191 nur die Bindung bestimmter Ahr-Liganden wie TCDD verhinderte, während er die Bindung anderer Substanzen, wie z.B. Flavonoide, zuließ. Damit scheint CH-223191 ein Liganden-selektiver Ahr-Antagonist zu sein (Zhao et al., 2010).

2.7.2 Endogene Liganden

Mittlerweile sind viele endogene Ahr-Liganden identifiziert und charakterisiert worden. Bei ihnen handelt es sich vor allem um Tryptophan-, Häm- und Arachidonsäuremetabolite aber auch Nahrungsbestandteile wie z.B. Pflanzenstoffe (Nguyen and Bradfield, 2008).

2.7.2.1 ITE (2-(1H-Indol-3-ylcarbonyl)-4-thiazolecarboxylicacidmethylester)

Bei dem endogenen Ahr-Liganden ITE scheint es sich um einen tolerogenen Ahr-Agonisten zu handeln (Baricza et al., 2016).

Sowohl die orale, als auch die parenterale Gabe von ITE, einem Derivat des Tryptophans, führte im EAE-Modell Ahr-abhängig zu einer Expansion der FoxP3⁺ T_{Reg}-Population und dadurch zu einer effektiven Suppression der EAE. Zusätzlich induzierte die Ahr-Aktivierung mit ITE tolerogene DCs *in vivo*. Diese tolerogenen DCs waren zusätzlich in der Lage, die T_{Reg}-Differenzierung über ein gesteigertes Retinolsäure-Signaling zu erhöhen (Quintana et al., 2010).

2.7.2.2 FICZ (5,11-Dihydroindolo[3,2-b]carbazole-6-carboxaldehyde)

FICZ ist ebenfalls ein Tryptophanderivat und entsteht vermutlich durch UV-Lichteinfluss in der Haut (Fritsche et al., 2007). Immunologisch führt die Aktivierung des Ahr durch FICZ *in vitro* zur Inhibierung der T_{Reg}-Differenzierung. *In vitro* unterstützt FICZ zusammen mit TGF- β , IL-6 und IL-23 die Differenzierung von T_H17-Zellen und führt dadurch *in vivo* zu einer T_H17-vermittelten Verschlechterung im EAE-Modell (Quintana et al., 2008). Im Gegensatz dazu führte die Aktivierung des Ahr mit FICZ im Mausmodell der Psoriasis vulgaris durch eine Reduktion von proinflammatorischen Mediatoren zu einer deutlichen Befundverbesserung (Di Meglio et al.).

Wie TCDD ist auch FICZ mittels Ahr-Aktivierung an der Differenzierung von regulatorischen T_R1-Zellen beteiligt (Apetoh et al., 2010). Des Weiteren führt die Ahr-Aktivierung durch FICZ zu einer gesteigerten Zytotoxizität, INF γ -Produktion und Tumorkontrolle von NK-Zellen (Shin et al., 2013). Insgesamt scheint die Ahr-Aktivierung durch FICZ sowohl eine pro- als auch eine anti-entzündliche Wirkung zu vermitteln.

2.7.2.3 L-Kynurenin (β -Anthraniloyl-L-alanin)

L-Kynurenin entsteht als erster Tryptophanmetabolit des IDO bzw. TDO2-Stoffwechselweges. Es konnte gezeigt werden, dass Kynurenine in der Lage sind den Ahr und damit auch die IDO zu aktivieren. Eine gesteigerte IDO-Expression in DCs führte zu einer gesteigerten T_{Reg} -Differenzierung. In T-Zellen führt die Ahr-Aktivierung durch Kynurenine zu einer gesteigerten T_{Reg} -Differenzierung, während sich kein Effekt auf die Differenzierung von T_H17 -Zellen nachweisen ließ (Mezrich et al., 2010).

2.8 Bedeutung des Ahr in der Leber

Der Ahr spielt eine essenzielle Rolle in einer Vielzahl von physiologischen Regulationsmechanismen im gesamten Organismus. Die wichtige Bedeutung des Ahr für die Leberhomöostase und die Leberimmunologie wird vor allem an den folgenden drei Punkten erkennbar:

2.8.1 Auswirkung eines fehlenden Ahr auf Funktion und Anatomie der Leber

Studien mit $Ahr^{-/-}$ Mäusen zeigen neben einer erhöhten Sterblichkeit und einer langsameren körperlichen Entwicklung sowie weiteren Defiziten, wie z.B. generellen Immundefekten, auch spezielle intrahepatische Auffälligkeiten. Die Lebern von $Ahr^{-/-}$ Tieren sind kleiner und weisen eine milde portale Fibrose auf. Außerdem konnte eine moderate Ansammlung von Entzündungszellen Rund um die Gallengänge (Cholangitis) beobachtet werden. Zusätzlich kommt es durch den Ahr-Knockout zu einer verlängerten extramedullären Blutbildung in den Lebern (Fernandez-Salguero et al., 1995, Schmidt et al., 1996).

Des Weiteren werden auch vaskuläre Veränderungen beschrieben. So führt ein persistierender Ductus venosus zu einem massiven portosystemischen Shunt und die Lebersinusoiden ähneln einer neonatalen Architektur (Lahvis et al., 2000).

Während sich das Fehlen des Ahr in Hepatozyten vor allem auf die Stoffwechselfähigkeiten auswirkt, scheint das Fehlen des Ahr in Endothelzellen ein Auslöser für die vaskulären Auffälligkeiten inklusive des offenen Ductus venosus zu sein (Walisser et al., 2005).

2.8.2 Die Rolle der Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO2) in der Leber

Die TDO2 ist ein Hepatozyten-spezifisches Enzym, welches eng mit der IDO verwandt ist. Genau wie die IDO, baut auch die TDO2 Tryptophan zu Kynurenin, einem aktivierenden Ahr-Liganden, ab. Dadurch können in der Leber Ahr-Liganden entstehen, die in der Lage sind, tolerogen z.B. auf DCs zu wirken und die Differenzierung von T_{Regs} zu beeinflussen (Stone et al., Mezrich et al., 2010).

2.8.3 Die Rolle des Ahr in der LPS-Toleranz

Die Toleranz gegenüber dem bakteriellen Zellwandbestandteil LPS ist ein wichtiger Bestandteil der hepatischen Immunregulation (Uhrig et al., 2005). Mehrere Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass der Ahr an der Regulation der Antwort auf eine LPS-Stimulation eine wichtige Rolle spielt. So zeigten Ahr-defiziente Mäuse nach Verabreichung einer primären, sublethalen LPS-Dosis, verglichen mit Wildtypen, eine deutlich erhöhte Letalität. Auch Mäuse, denen das leberspezifische Enzym TDO2, das tolerogene Ahr Liganden produziert, fehlte, zeigten nach LPS-Gabe eine erhöhte Sterblichkeit (Bessede et al., 2014). Mechanistisch scheint der Ahr die Freisetzung verschiedener Zytokine im Verlauf der LPS-Antwort zu kontrollieren. Während in Mäusen mit Ahr-Expression nach der LPS-Stimulation die Plasmakonzentrationen der proinflammatorischen Zytokine IL-1b, IL-6 und TGF α zu Beginn anstiegen und anschließend wieder abfielen, sorgte der Ahr gleichzeitig auch für eine steigende Sekretion des antiinflammatorischen IL-10. Sowohl der Abfall der entzündungsfördernden Zytokine, als auch die zunehmende Sekretion des entzündungshemmenden IL-10 konnte in Ahr-defizienten Mäusen nicht beobachtet werden, sodass hier die Zytokinproduktion dysreguliert zu sein schien (Bessede et al., 2014, Kimura et al., 2009).

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass der Ahr essenziell für die Etablierung einer Toleranz gegenüber einer erneuten LPS-Stimulation ist. Im LPS-toleranten Status von Mäusen sanken die Plasmakonzentrationen von TGF- α und IL-6, während die Plasmakonzentrationen von IL-10 und TGF- β anstiegen. Die hierfür nötige Produktion von TGF- β in DCs scheint durch eine Ahr-assoziierte Aktivierung der Src-Kinase und einer damit einhergehenden Phosphorylierung der IDO-1 ermöglicht zu werden (Bessede et al., 2014).

In Makrophagen wird der Ahr nach TLR-Stimulation mit LPS vermehrt exprimiert und scheint in Kombination mit dem Transkriptionsfaktor STAT1 die LPS-vermittelte Produktion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen zu kontrollieren. Das Fehlen des Ahr führte nach LPS-Stimulation zu einer gesteigerten Produktion inflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNF- α und IL-12p40. Die LPS-induzierte Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 zeigte sich hingegen deutlich vermindert. Daher scheint der Ahr im LPS-TLR4 Signalweg von Makrophagen entzündungshemmend zu wirken (Kimura et al., 2009).

In der Leber sind vor allem LSECs und Kupffer-Zellen aber auch DCs an der LPS-Toleranz beteiligt (s.o.). Auch hier spielt eine reduzierte IL-6 Produktion eine entscheidende Rolle (Uhrig et al., 2005). Die Bedeutung des Ahr für die LPS-Toleranz in LSECs ist jedoch bisher noch nicht untersucht worden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Für die Durchführung der Experimente wurden die in Tabelle 1 aufgelisteten Geräte verwendet.

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Avanti™ J-20XP Centrifuge	Beckman Coulter™, CA USA
Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Centrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg
CO ₂ Inkubator	Sanyo Denki K.K, Moriguchi Japan
Cryotom microm HM550	Thermo Fischer Scientific, MA USA
Durchflusszytometer: LSR II, FACS Canto	BD Biosciences, Heidelberg
Elisa-Reader Infinity F50	Tecan, Männedorf; Schweiz
Feinwaage Sartorius analytics A200s	Sartorius AG, Göttingen
Glasware	VWR International GmbH, Darmstadt
Kühlschrank (4°C)	Liebherr, Kirchdorf
Küvetten	VWR International GmbH, Darmstadt
Metallsieb	VWR International GmbH, Darmstadt
Mikroskop BH-2	Olympus, Tokio Japan
Mikroskop BZ-9000	Keyence, Osaka Japan
Mikroskop DM IRB	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikrotom	Slee medical, Mainz
Nanodrop™ 2000	Thermo Fischer Scientific, MA USA
Neubauer-Zählkammer „Marienfeld-Superior“	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
PCR/ Thermo Cyclers “peqSTAR” 2x Gradient	VWR Peqlab, PA USA
Perfusionspumpe	Ismatec, Wertheim
pH-Meter „SevenEasy“	Mettler Toledo, OH USA
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg

Pipetierhilfe „Pipetboy“	Integra Biosciences AG, Zizers; Schweiz
Plattformschüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
Präparationsbesteck	VWR International GmbH, Darmstadt
QuadroMACS™ Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Tiefkühltruhe (-20°C) Liebherr „Comfort No frost“	Liebherr, Kirchdorf
Tiefkühltruhe (-80°C) Sanyo ultra low	Sanyo Denki K.K, Moriguchi; Japan
Tischzentrifuge My Fuge	Benchmark Scientific, NJ USA
ViiA7™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems, CA USA
Waage	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Wärmeplatte Präzitherm	Harry Gestigkeit GmbH, Düsseldorf
Wasserbad	GFL, Großburgwedel

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Für die Durchführung der Experimente wurden die in Tabelle 2 aufgelisteten Materialien verwendet.

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Alufolie	Roth, Karlsruhe
Anti FITC Micro Beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
antifect® N fluid	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
CD146 (LSEC) Micro Beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD4 Beads L3T4	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Cell Strainer 100µm, 40µm	greiner bio-one, Frickenhausen
CellStar® Tubes 15ml + 50ml	greiner bio-one, Frickenhausen
Collagenase NB (C. histolyticum)	Serva, Heidelberg
Combitips advanced 0,5ml; 1ml; 5ml; 10ml	Eppendorf, Hamburg
CryoPure Tubes 1,6ml	Sarstedt, Nümbrecht

DAKO Fluoromount	Dako North America, Inc. CA USA
DNase I	Roche, Mannheim
Einbettkassetten	KABE Labortechnik GmbH, Nümbrecht
Einmal-Spritze	B. Braun, Melsungen
2ml; 5ml; 10ml	
Entsorgungsbeutel 200x300mm	Roth, Karlsruhe
EUKITT® Einschlussmittel	O. Kindler GmbH, Freiburg
Feindosierungsspritze Injekt®-F 1ml	B. Braun, Melsungen
Filtropur BT50 500ml Bottle Top Filter (0,2µm)	Sarstedt, Nümbrecht
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	gibco/life technologies, CA USA
Kanülen Sterican®	B. Braun, Melsungen
KAPA Probe Fast Master Mix	Kapa Biosystems; MA USA
KAPA Probe Fast ROX Low	Kapa Biosystems; MA USA
MACS® LS-Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS® Pre-Seperation Filters	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Maus IgG	Sigma-Aldrich, Steinheim
Metallsieb 100µm	VWR International GmbH, Darmstadt
MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate	applied biosystems® by life technologies™, CA USA
Multiply® -µStrip Pro	Sarstedt, Nümbrecht
Nagerfutter	Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage
Nunc ELISA Plates	Sigma-Aldrich, Steinheim
Objektträger	Roth, Karlsruhe
OneComp eBeads	eBioscience/ Thermo scientific, MA USA
OptiPrep™ Density Gradient Medium	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pacific Orange™ succinimidyl ester	invitrogen/Thermo Fisher Scientific, MA USA
Parafilm® Laboratory Film	Bemis Company, WI USA
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Probengefäß für Cobas bio	Sarstedt, Nümbrecht
Reagent Reservoir steril	VWR International GmbH, Darmstadt

Reaktionsgefäß 5ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 0,5ml; 1,5ml; 2ml	Sarstedt, Nümbrecht
Receiver Bottle 500ml	Sarstedt, Nümbrecht
Röhren, Flow Cytometry	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten 2ml; 5ml; 10ml; 25ml; 50ml	Sarstedt, Nümbrecht
Steriflip®	Merck, Darmstadt
Tissue Tek®	Sakura Finetek, Alpen aan den Rijn, Niederlande
Zellkulturplatten Flachboden, Rundboden 96-well	Sarstedt, Nümbrecht
α-CD11c Micro Beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

3.1.3 Lösungen, Flüssigkeiten und Chemikalien

Für die Durchführung der Experimente wurden die in Tabelle 3 aufgelisteten Substanzen verwendet.

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Lösungen, Flüssigkeiten und Chemikalien

Substanz	Hersteller
Aqua	B. Braun, Melsungen
2-(1H-Indol-3-ylcarbonyl)-4-thiazolecarboxylic acid methylester (ITE)	Tocris Bioscience/bio-technie, Wiesbaden
2,3,7,8- Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)	Sigma-Aldrich, Steinheim
5,11-Dihydroindolo[3,2-b]carbazole-6-carboxaldehyde (FICZ)	Enzo Life Sciences, Lörrach
Aceton (reinst)	chemsolute®/TH. Geyer, Renningen
Bovines Serumalbumin Fraction V (BSA)	Roche, Mannheim
CH-223191 (AHR-Inhibitor)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
2-Propanol	Merck, Darmstadt
Eosin G-Lösung 0,5% wässrig	Roth, Karlsruhe

Ethanol vergärt	Roth, Karlsruhe
Fetal Bovin Serum	PAA/ GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire; GB
Hämalaun nach Meyer (sauer)	Roth, Karlsruhe
HOECHST 33258 pentahydrate	invitrogen/Thermo Fisher Scientific, MA USA
Ketamin 10%	Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG (WDT), Hoyerhagen
Kollagen R	Serva, Heidelberg
Lipopolysaccharid E.coli (055:B5)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nuclease free H ₂ O	Quiagen, Venlo; Niederlande
Paraformaldehyd (PFA)	Morphisto GmbH, Frankfurt a.M.
Penicillin/Streptomycin	gibco/life technologies, CA USA
Rompun 2%	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Roti®-Histofix 4%, Formaldehydlösung	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCL)	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure 1N Lösung	Roth, Karlsruhe
Sirius Rot Farbstoff	Sigma-Aldrich, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau (0,4%)	gibco/life technologies, CA USA
Toluol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Xylol/Xylene	J.T. Backer®/Fisher scientific, Schwerte
β-Anthraniloyl-L-alanin (L-Kynurenine)	Sigma-Aldrich, Steinheim

3.1.4 Puffer

Die für die Experimente benötigten Pufferlösungen setzten sich aus den unten stehenden Einzelchemikalien zusammen. Wenn dies benötigt wurde, wurden die Pufferlösungen unter sterilen Bedingungen angesetzt bzw. im Anschluss steril filtriert.

Tabelle 4: Übersicht und Zusammensetzung der verwendeten Puffer

Name	Einzelchemikalien	Konzentration
1x Phosphatgepufferte Salzlösung		
(PBS)	KCL	2,7mM
	KH ₂ PO ₄	1,5mM
	NaCl	137mM
	Na ₂ HPO ₄	6,5mM
→ auf pH 7,4 eingestellt		
Gey's balanced salt solution		
(GBSS)	NaCl	137mM
	KCL	5mM
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,6mM
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,9mM
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,3mM
	KH ₂ PO ₄	0,2mM
	Na ₂ HPO ₄ (pH 7,4)	1,7mM
	NaHCO ₃	2,7mM
	D(+) Glucose	5,5mM
	Hepes	50mM
→ auf pH 7,4 eingestellt und steril filtriert		
1x ACK		
	NH ₄ Cl	150mM
	KHCO ₃	10mM
	EDTA	100mM
MACS-Puffer		
	1xPBS	
	0,5% BSA	
	2,5mM EDTA	

3.1.5 Antikörper

Für die Durchführung der Experimente wurden die in Tabelle 5 aufgelisteten Antikörper verwendet.

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Antikörper

Antigen	Farbstoff	Klon	Hersteller
Ahr	PE	4MEJJ	eBioscience
Anti Mouse CD16/32		93	eBioscience
CD4	AF647	GK1.5	BioLegend
CD11c	APC	N418	BioLegend
	Brilliant Violet 421™	N418	BioLegend
	Pacific Blue™	N418	BioLegend
CD146	APC	ME-9F1	BioLegend
	PE	ME-9F1	BioLegend
CD31	AF488	390	BioLegend
CD31 Rabbit		Polyklonal	Abcam
CD80 (B7-1)	PE	16-10A1	eBioscience
CD86 (B7-2)	FITC	GL-1	BD Biosciences
CK19 (Troma-III)		Monoklonal	DSHB
Donkey anti Goat IgG	AF546	Polyklonal	Invitrogen
Donkey anti Rabbit IgG	AF546	Polyklonal	Invitrogen
Donkey anti Rat IgG	AF488	Polyklonal	Invitrogen
IA-IE	FITC	2G9	BD Biosciences
Mouse/Rat CD31/PECAM-1 (goat IgG)		Polyklonal	R&D Systems

3.1.6 Kits

Für die Durchführung der Experimente wurden die in Tabelle 6 aufgelisteten Kits verwendet.

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Kits

Kit	Hersteller
DNA, RNA, and Protein Purification Kit “Nucelo Spin® RNA/Protein”	Macherey-Nagel, Düren
DuoSet Elisa Mouse IL-6 Mouse TGF-β	R&D Systems/bio-techne, Wiesbaden
FoxP3 Staining Buffer Set	eBioscience, Frankfurt
High capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems™, MA USA

3.1.7 Sonden für die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Für die Durchführung der Experimente wurden die in Tabelle 7 aufgelisteten Sonden verwendet.

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Sonden

Gen	Spezies	
Hprt	Maus	Mm 01545399_M1
Hprt	Maus	Mm 03024075_m1
IL-6	Maus	Mm 00446190_m1
NOS2	Maus	Mm 00440502_M1
NOS3	Maus	Mm 00435217_M1
VEGFa	Maus	Mm 00437306_M1

3.1.8 Versuchstiere

Die als Versuchstiere verwendeten Mäuse wurden in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gezüchtet und gehalten. Alle Tierexperimente wurden mit der Genehmigung der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg durchgeführt (Genehmigungsnummer: 53/15).

Es wurden ausschließlich Mäuse mit C57BL/6J Hintergrund verwendet. Um Mäuse mit Endothel-spezifischer Ahr-Defizienz zu erhalten, wurden Mäuse der Linien Ahr^{tm3}.1Bra/J (Ahr^{fx}) und B6.FVB-Tg(Cdh5-cre)7Mlia/J (VE-CRE) miteinander verpaart. In Ahr^{fx} Mäusen ist das Exon 2 des Ahr-Genes mit Erkennungssequenzen (loxP) der Cre-Rekombinase frankiert (Walisser et al., 2005). Bei Mäusen der Linie B6.FVB-Tg(Cdh5-cre)7Mlia/J wird die Expression der Cre-Rekombinase durch den Promoter des VE-Cadherin (Cdh-5) reguliert. Kreuzt man nun homozygote Mäuse der Linie Ahr^{tm3}.1Bra/J mit heterozygoten Mäusen der Linie B6.FVB-Tg(Cdh5-cre)7Mlia/J, erhält man in der F1 Generation unter anderem Mäuse, die sowohl heterozygot für die loxP-Sequenzen im Ahr-Gen, als auch für die Cdh-5 abhängige Cre-Rekombinase sind. Werden diese Tiere erneut mit homozygoten Ahr^{tm3}.1Bra/J Mäusen der Elterngeneration verpaart, erhält man in der F2 Generation unter anderem Tiere, die für die loxP-Sequenzen im Ahr Gen homozygot und für die Cre-Rekombinase heterozygot sind. Tiere mit diesem Genotyp werden nun untereinander verpaart, um Nachkommen (F3) zu erhalten, die eine Endothel-spezifische Ahr-Defizienz aufwiesen (homozygot für Ahr^{fx} und heterozygot für Cdh-5; Cdh-5^{Δ/ΔAhr}) sowie deren Ahr-profiziente Wurfgeschwister (homozygot für Ahr^{fx} bei fehlender Expression der Cre-Rekombinase; Ahr^{fl/fl}). Die Wurfgeschwister konnten in den Experimenten als Kontrolltiere benutzt werden.

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Mauslinien

Mauslinie	
C57BL/6J	Hintergrund
Ahr ^{tm3} .1Bra/J	Ahr-Gen mit von loxP-Sequenzen frankiertem Exon 2
B6.FVB-Tg(Cdh5-cre)7Mlia/J	Expression der Cre-Rekombinase unter dem Promoter von Cdh-5
Ahr ^{fl/fl}	Wurfgeschwister
Cdh-5 ^{Δ/ΔAhr}	Mäuse mit Endothel-spezifischer Ahr-Defizienz

3.1.9 Software

Für die Erstellung dieser Arbeit kam die in Tabelle 9 aufgelistete Software zum Einsatz.

Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Software

Software	Hersteller
FACS Diva 6	BD Bioscience, NJ USA
Graph Pad Prism 5	GraphPad Software Inc., CA USA
Magellan for F50	Tecan Group, Männedorf Schweiz
Microsoft Excel 15	Microsoft Corp., WA USA
Microsoft Word 15	Microsoft Corp., WA USA
Nanodrop 2000/2000c Software Version 1.6.198	Thermo Fisher scientific, MA USA
ViiATm 7 Software Version 1.2.4	Applied Biosystems™, MA USA

3.2 Methoden

3.2.1 Isolation von sinusoidalen Leberendothelzellen

Die Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion von überdosierter Ketamin/Xylazin-Narkose (15 ml/kg Maus (12 mg/ml Ketamin + 1,6 mg/ml Xylazin)) getötet. Nun erfolgten eine oberflächliche Desinfektion und die Eröffnung des Peritoneums mithilfe einer Schere. Nachdem sowohl die V. cava inferior als auch die V. portae dargestellt werden konnten, erfolgte das Einlegen der Perfusionskanüle in die V. portae. Nach Eröffnung der unteren Hohlvene wurde die Leber über die Pfortader mit 37°C warmer Kollagenaselösung (0,05%ig in GBSS) für ca. 20 s perfundiert, bis die Leber eine hellbraune Farbe angenommen hatte. Anschließend wurde die Leber herauspräpariert und die Gallenblase entfernt. Wurden die Zellen für Zellkulturexperimente benötigt, erfolgten alle weiteren Arbeiten unter einer sterilen Werkbank mit sterilen Materialien. Sollten ausschließlich Analysen mittels Durchflusszytometrie durchgeführt werden, konnte die Zellisolation unsteril erfolgen. Nun erfolgte eine manuelle Homogenisierung des Leberparenchyms mittels Pinzette und Schere in einer Petrischale. Das so entstandene Leberhomogenisat wurde nun in ein Reaktionsgefäß überführt und in einer Mischung aus Kollagenase und DNase I (ca. 3 ml Kollagenase/Leber, 50 µl DNase I (1000 U/ml) bei 37°C im Schüttelbad) weiterverdaut. Anschließend wurde die Lebersuspension durch ein Metallsieb (\varnothing 100 µm) transferiert. Die dadurch entstandene Einzelzellsuspension wurde mit PBS gewaschen und durch zweimalige Zentrifugation (5 min, 40 g) vom Großteil der Hepatozyten befreit. Die verbliebenen Zellen wurden durch Zentrifugation (7 min, 400 g) pelletiert und das entstandene Pellet in PBS zu einem Gesamtvolumen von 5 ml resuspendiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Zellen mithilfe einer Dichtegradientenzentrifugation. Dazu wurde die Zellsuspension in einem 15 ml Reaktionsgefäß mit 2 ml OptiPrep vermischt, mit 1 ml PBS überschichtet und bei Raumtemperatur (RT) ohne Bremse zentrifugiert (20 min, 400 g). Durch die Zentrifugation wurden die Zellen dichteabhängig in verschiedene Banden aufgetrennt. Die nicht-parenchymatösen Zellen (NPCs) befanden sich in der Interphase (zwischen PBS und Erythrozytenbande). Sie wurden mit einer Pipette abgenommen, in ein neues Röhrchen überführt, mit PBS gewaschen und abzentrifugiert (7 min 400 g). Nach einer Zellzählung erfolgte nun die Aufreinigung der LSECs mittels magnetischer Zellseparation (Magnetic Activated Cell Sorting / MACS). Bei diesem Prinzip werden spezielle, magnetische MicroBeads über Antikörper an die Zielzellen gekoppelt. So können diese Zellen in einem starken Magnetfeld in Säulen zurückgehalten werden und von den übrigen unmarkierten Zellen abgetrennt werden. Entfernt man die Säule anschließend aus dem Magnetfeld, so können die selektierten Zielzellen aus der Säule eluiert werden.

Dazu wurden die Zellen in MACS Puffer aufgenommen (10^8 Zellen/ml) und mit Maus-IgG geblockt (2 μ l, 10 min, 4 °C). Nach erneutem Waschen mit PBS (10 min, 400 g) wurden die Zellen erneut in MACS-Puffer aufgenommen (90 μ l/ 10^7 Zellen) und mit Fc-Block (anti-CD16/32) behandelt, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden (10 min, 4 °C). Anschließend erfolgte die Inkubation mit an anti-CD146 Antikörper gekoppelten magnetischen Beads (LSEC MicroBeads, Milteny Biotec, 10 min, 4 °C).

In der Zwischenzeit wurde eine LS Säule (LS Columns, Milteny Biotec) in den Magnetständer eingespannt und mit 3 ml MACS Puffer äquilibriert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen durch einen Pre-Separation Filter auf die Säule gegeben. Der Filter und das Reaktionsgefäß, in dem sich die Zellen befanden, wurden anschließend mit je einem Milliliter MACS Puffer gespült und der verwendete Puffer ebenfalls auf die Säule gegeben. Die mit den magnetischen Beads gekoppelten CD146 positiven LSECs, blieben nun durch das starke Magnetfeld in der Säule hängen, während alle übrigen Zellen durch dreimaliges Spülen mit jeweils 3 ml MACS Puffer aus der Säule gewaschen wurden. Die Zielzellen konnten nach Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld mithilfe von 5 ml MACS Puffer in ein frisches Reaktionsgefäß eluiert werden. Durch eine erneute Pelletierung, Zählung (3.2.2.1) und Resuspension der Zellen in einem geeignetem Medium war es nun möglich, die gewünschte Zielkonzentration der Zellen einzustellen.

3.2.2 Zellkultur

3.2.2.1 Zellzahlbestimmung

Die Zellzählung erfolgte mithilfe einer Neubauer Zählkammer. Dazu wurden die Zellen, je nach erwarteter Zellzahl, entweder 1:10 oder 1:100 mit 0,4%iger Trypanblau-Lösung verdünnt. Anschließend wurden 10 μ l in die Zählkammer pipettiert. Eine Blaufärbung der Zellen signalisierte eine durchlässige Zellmembran und damit den Tod der Zelle. Es wurden nur lebende Zellen in zwei gegenüberliegenden Großquadraten ausgezählt. Die endgültige Zellzahl wurde mittels folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl} = \left(\frac{x}{2}\right) \times y \times z \times 10^4$$

- x = Zellzahl in beiden Großquadraten
- y = Volumen der Zellsuspension
- z = Verdünnungsfaktor
- 10^4 = Kammerfaktor

3.2.2.2 Kultivierung primärer LSEC

Sämtliche für die Zellkulturexperimente verwendeten LSECs wurden unter möglichst sterilen Bedingungen als Primärkulturen aus den entnommenen Lebern gewonnen. Die Zellen wurden im Brutschrank unter standardisierten Bedingungen (37 °C, 5 % CO₂) kultiviert. Alle weiteren, an der Kultur vorgenommenen, Maßnahmen fanden unter sterilen Bedingungen unter einer Werkbank und mit sterilen Materialien statt.

Für die Kultur von LSECs wurden 96-well Flachboden Zellkulturplatten verwendet. Um den Endothelzellen möglichst optimale Kulturbedingungen bieten zu können, wurden die Platten zuvor mit einem Kollagenfilm beschichtet. Dazu wurde jedes Well mit 50 µl einer Kollagen R-Lösung (0,2 mg/ml) für mindestens 1 h im Brutschrank inkubiert. Nachdem die Wells mit PBS gespült und so die restlichen Kollagenrückstände entfernt worden waren, konnte man die Platten nun zur Kultivierung von LSECs verwenden. Als Medium wurde Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) verwendet, welches mit 1% Penicillin/Streptomycin und 10% Fetal Bovine Serum (FCS) versetzt wurde. Die LSECs wurden in unterschiedlichen Konzentrationen (1-2 x 10⁵/Well) ausgesät. Am Folgetag wurden die Wells mit sterilem PBS gewaschen, um nicht adhäsive und tote Zellen sowie Zelltrümmer aus der Kultur zu entfernen. Zudem erfolgte ein Wechsel des Mediums. Anschließend waren die Zellen bereit für weitere Maßnahmen und Analysen, wie z.B. die Zugabe von Liganden oder Inhibitoren.

Zur Stimulation der Zellen wurde Lipopolysaccharid (LPS) verwendet. Dieses wurde meist zusammen mit anderen Liganden oder Inhibitoren in einem Mastermix zur Kultur gegeben. Die Zellen wurden dann für 24 h bei Standardbedingungen kultiviert, bevor der Zellkulturüberstand abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C eingefroren wurde.

3.2.3 Charakterisierung von Zellen

3.2.3.1 Zytokinanalyse aus Zellkulturüberständen und Seren

Der Nachweis und die Konzentrationsbestimmung von Zytokinen in Zellkulturüberständen oder Seren wurde mithilfe eines Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt. Bei dieser Nachweismethode wird die nachzuweisende Substanz mithilfe eines Antikörpers (Capture Antikörper) an eine Platte gebunden und dort von einem zweiten Antikörper (Detection Antikörper) markiert. An diesen biotinylierten sekundären Antikörper kann nun ein Streptavidin-gekoppeltes Enzym binden, welches ein meist farbloses Substrat in ein farbiges Produkt umsetzt. Die optische Dichte des Produktes kann nun mit einem ELISA-Reader ausgelesen werden. Durch den Vergleich mit einer Standardverdünnungsreihe ist es möglich, auf die Probenkonzentration zurückzuschließen.

Der ELISA wurde stets nach Herstellerangaben durchgeführt. Alle Antikörper, Standards, Enzyme und Proben, mit Ausnahme des Capture Antikörpers (Verdünnung in PBS), wurden im jeweiligen Reagent Diluent (nach Herstellerangaben) verdünnt.

Zu Beginn wurde eine 96-Well NUNC[®] Elisa Platte (Sigma) mit dem Capture Antikörper (100 µl/Well) beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurden die nicht gebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen mit einer Waschflüssigkeit (300 µl/Well), bestehend aus 0,05% Tween20 in PBS, entfernt und die Platte mit 1 % BSA in PBS (300 µl/Well) für 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Proben bzw. der Standardreihe (2 h, RT, Rüttelplatte). Von beidem wurden jeweils 50 µl eingesetzt. Dabei wurden die Proben je nach erwarteter Konzentration entweder unverdünnt eingesetzt oder mit Reagent Diluent verdünnt. Für die Standardreihe wurde rekombinantes Protein verwendet, dessen Konzentration sich mit jedem Verdünnungsschritt halbierte. So konnte anschließend auf die Konzentration in der Probe zurückgerechnet werden. Um mögliche Pipettierfehler zu berücksichtigen, erfolgte eine Doppelbestimmung der Standardreihe. Nach erneutem, dreimaligem Waschen wurde der biotinylierte Detection Antikörper (100 µl/Well) zugegeben (2 h, RT, Rüttelplatte). Der Detection Antikörper band nun in der Probe die Zielsubstanz. Nach einem erneuten Waschschrift wurde die Streptavidin-Horse-Radish Peroxidase zugegeben, die über das Biotin an den Detection Antikörper gebunden wurde (100 µl/Well, Inkubation für 20 min, RT, lichtgeschützt). Dieses Enzym war nun in der Lage, das nach erneutem Waschen hinzugegebene Substrat TMB (100 µl) umzusetzen, was zu einem Farbumschlag in der Probe führte. Dieser Vorgang wurde durch die Zugabe von 1 molarer Schwefelsäure (50 µl/Well) gestoppt. Die optische Dichte konnte dann, mithilfe des Infinity F50 (Tecan), bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Wellenlängenkorrektur von 540 nm oder 570 nm photometrisch gemessen werden. Die Umrechnung der optischen Dichte in die entsprechende Proteinkonzentration erfolgte mit dem Programm Magellan for F50 (Tecan).

3.2.3.2 Zellanalyse mittels Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie konnten Zellen anhand verschiedener Merkmale wie Größe, Granularität sowie oberflächlichen, als auch intrazellulären Antigenen genauer charakterisiert werden. Dabei passiert jede Zelle mehrere unterschiedliche Laserstrahlen. Das Laserlicht wurde entweder von den Zellen gebrochen (Forward / Sideward Scatter, Größe und Granularität) oder regte Fluorochrome an, die, gekoppelt an Antikörper, die verschiedenen Zielantigene auf oder in der Zelle markieren. Das gebrochene oder von den Fluorochromen emittierte Licht wird von verschiedenen Detektoren erfasst, verstärkt und kann anschließend mithilfe einer Analysesoftware als Datenpunkt in einem Graph dargestellt werden.

a) Färben von Oberflächenantigenen

Die Zellen wurden in PBS aufgenommen ($10^5 - 5 \times 10^6$ Zellen / 100 μ l) und auf 5 ml Röhrchen verteilt. Anschließend erfolgte die Lebend / Tot-Färbung mit PACO-NHS. Dieser Farbstoff ermöglicht später eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen, da der Farbstoff nur in Zellen eindringen kann, wenn die Zellmembran beschädigt ist. Der Farbstoff wurde in einer Verdünnung von 1:1000 zur Probe gegeben und durch Vortexen gründlich vermischt und inkubiert (20 min, 4 °C). Der überschüssige Farbstoff wurde durch Zugabe von 1 ml PBS und Zentrifugation (5 min, 400 g) aus der Probe gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung der Oberflächenantigene mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern. Dazu wurden die Zellen in einem vorbereiteten Mastermix aufgenommen (100 μ l), in dem bereits alle benötigten Antikörper in einer 1:100 Verdünnung vorlagen. Die Antikörper wurden für 15 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Probe gewaschen. Sollten nur Oberflächenantigene angefärbt werden, wurden die Zellen in 200 μ l PBS aufgenommen und direkt analysiert. War eine direkte Analyse am Durchflusszytometer nicht möglich, wurden die Zellen durch Zugabe von 4 %iger PFA-Lösung fixiert. So waren die Zellen bei 4 °C für einige Tage lagerbar.

b) Färben von intrazellulären Antigenen

Sollten auch intrazelluläre Antigene angefärbt werden, erfolgte die Färbung mithilfe des FoxP3 Staining Buffer Set (eBioscience). Die Zellen wurden in 100 μ l eines zuvor 1:4 verdünnten (1 Teil Konzentrat, 3 Teile Diluent) Fixations / Permeabilisierungs-Puffer aufgenommen und inkubiert (30 min, 4 °C). Anschließend wurden die Zellen mit einem 1:10 mit H₂O verdünnten Permeabilisierungs-Puffer gewaschen. Die Färbung erfolgte, ähnlich wie bei den Oberflächenantigenen, durch Zugabe von 50 μ l eines Mastermixes (1:50 verdünnte Antikörper in Permeabilisierungs-Puffer). Nach gründlicher Durchmischung wurden die Proben über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 500 μ l Permeabilisierungs-Puffer gewaschen und danach in 200 μ l PBS aufgenommen.

Durchflusszytometrie

Die Analyse der Zellen erfolgte im Durchflusszytometer (FACS Canto; LSRII). Um zu vermeiden, dass die verschiedenen Fluoreszenzkanäle sich gegenseitig überlagerten, erfolgte vor der Analyse eine Kompensation mittels Einzelfärbungen für jedes in den Proben vorkommende Fluorochrom. Dazu wurden entweder Zellen oder spezielle Kompensationsbeads (OneComp Beads, eBioscience) mit einem Fluorochromgekoppelten Antikörper gefärbt. Um eine Differenzierung von toten und lebenden Zellen zu ermöglichen, wurde zusätzlich eine Vergleichsprobe mit toten, PACO-NHS gefärbten Zellen eingelesen.

Außerdem wurde eine ungefärbte Zellprobe eingelesen, um eine mögliche Hintergrundfluoreszenz der Zellen aus der Analyse herausrechnen zu können. In die Analyse wurden nur lebende Einzelzellen eingeschlossen. Die Auswertung erfolgte mit der Software FACS Diva6 (BD Biosciences).

3.2.4 Molekularbiologische Methoden

3.2.4.1 RNA Isolation

Die Isolation von RNA erfolgte aus Gewebeproben oder Zellen. Die Gewebeproben wurden direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert, während die Zellen direkt nach ihrer Isolation weiterverarbeitet wurden. Die Isolation erfolgte mit dem „DNA, RNA and Protein purification Kit“ Nucleo Spin® RNA (Macherey-Nagel) unter RNase freien Bedingungen nach Herstellerangaben.

Im ersten Schritt wurde das Ausgangsmaterial in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß durch Mörsern zerkleinert. Anschließend erfolgte die Zelllyse mit 350 μl Reaktionspuffer und 3,5 μl β -Mercaptoethanol. Nach gründlichem Mischen wurde das Lysat zum Filtern auf einen NucleoSpin Filter gegeben und zentrifugiert (1 min, 11.000 g). Um die benötigten Bedingungen für die spätere Bindung der RNA zu erreichen, wurde dem Lysat nun 350 μl 70%iger Ethanol zugesetzt und durch auf- und abpipettieren gründlich gemischt. Anschließend wurde eine NucleoSpin RNA Column mit dem Gemisch beladen, welches durch Zentrifugation (1 min, 11.000 G) durch die Membran gefiltert wurde. Diese Membran band die Nukleinsäuren, sodass diese aus dem Lysat isoliert wurden. Im nächsten Schritt wurde die Membran durch Zugabe von 350 μl Membrane Desalting Buffer (MDB) und Zentrifugation (1 min, 11.000 g) getrocknet. Um nun die RNA von der noch vorhandenen kontaminierenden DNA zu trennen, wurde die DNA verdaut. Dazu wurde die Membran nach Zugabe von 95 μl einer DNase für 15 min bei RT inkubiert. Nachdem die DNA auf der Membran verdaut wurde, wurde die RNA durch drei Waschschriffe von den Überresten gereinigt.

Dazu wurden jeweils verschiedene Puffer zugegeben (1. 200 µl RAW2, 2. 600 µl RA3 Puffer, 3. 250 µl RA3 Puffer) und anschließend jeweils zentrifugiert (Schritt 1. und 2. je 1 min, 11.000 g, Schritt 3. 2 min 11.000 g). Abschließend wurde die RNA durch Zugabe von 60 µl RNase-freiem Wasser und Zentrifugation (1 min, 11.000 g) in ein frisches Reaktionsgefäß eluiert. Die Konzentrations- und Reinheitsmessung erfolgte mithilfe des NanoDrop 2000 (Thermo Fischer). Dieses Gerät ist in der Lage, mittels UV/VIS-Spektroskopie, bereits in 1 µl der unverdünnten Probe die Konzentration sowie eine mögliche Verunreinigung mit DNA oder Proteinen zu ermitteln.

Dazu wird eine abgewandelte Form des Lambert-Beer'schen Gesetzes verwendet:

$$c = \frac{(A \times \epsilon)}{b}$$

c = Nukleinsäurenkonzentration in ng/µl

A = Absorption in AU („arbitrary Units“ – willkürliche Einheiten)

ε = wellenlängenabhängiger Extinktionskoeffizient in ng-cm/µl

b = Schichtdicke in cm

Zur Beurteilung der Reinheit der RNA-Probe wird das Verhältnis zwischen der Absorption bei 260nm und 280nm gebildet. Ein Verhältnis von 260/280 bei ~ 2 gilt als „rein“ für RNA (Handbuch NanoDrop 2000). Minimal konnten RNA-Konzentrationen von 2ng/µl > x < 15.000 ng/µl unverdünnt gemessen werden (Detektionslimit).

Die isolierte RNA wurde nun entweder bei -80 °C gelagert oder, wie in 3.2.4.2. beschrieben, in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben.

3.2.4.2 Umschreibung von RNA in cDNA mittels Reverser Transkription

Zur Umschreibung der gewonnenen RNA (siehe 3.2.4.1) in cDNA wurde das High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) verwendet. Dieses Kit enthält die benötigten Nucleotide und Primer sowie eine reverse Transkriptase. Bei der physiologischen Transkription im Rahmen der Genexpression werden die DNA-Abschnitte des zu exprimierenden Gens durch RNA-Polymerasen abgelesen. Nachdem die Polymerase den passenden Promotor erkannt hat wird die DNA-Doppelhelix entwunden und nach der Synthese eines Primers synthetisiert eine Polymerase eine zur DNA-Matrix komplementäre messenger RNA (mRNA).

Diese mRNA kann anschließend zur Proteinbiosynthese verwendet werden. Die reverse Transkriptase, ein bakterielles Enzym, ist in der Lage, durch reverse Transkription eine mRNA Vorlage wieder in cDNA umzuschreiben. Da RNA leicht durch RNAsen zerstört werden kann, erfolgten alle Arbeitsschritte unter maximaler Vermeidung von Kontamination mit RNAsen (gesonderter Arbeitsplatz, Handschuhe, separate Pipettenspitzen) und stets auf Eis. Außerdem wurde dem Mastermix ein RNase-Inhibitor zugesetzt, der sich ebenfalls im Kit befand.

Um in jeder Probe die gleiche Menge RNA umzusetzen, wurden die Proben anhand der im Nanodrop bestimmten Konzentrationen mit nukleasefreiem Wasser auf eine Endkonzentration von 500 ng in 13,2 µl verdünnt. Anschließend wurde der Mastermix (6,8 µl / Probe, Zusammensetzung siehe unten) zur RNA gegeben. Nach gründlichem Mischen wurde das Reaktionsgemisch für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in den PCR Cycler gestellt.

Tabelle 10: PCR-Mastermix

Bestandteil	Menge
Reaction Buffer	2 µl
dNTPs (100 mM)	0,8 µl
Random Primer	2 µl
rev. Transcriptase	1 µl

Tabelle 11: PCR-Zyklus

Temperatur	Dauer
25°C	10 min
37°C	120 min
85°C	5 min
4°C	5 min

Abschließend wurde die cDNA mit nukleasefreiem Wasser verdünnt und bei -80 °C gelagert oder direkt weiterverarbeitet.

3.2.4.3 Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR)

Um das Expressionslevel von Genen zu untersuchen, wurde die Echtzeit- oder quantitative Polymerase-Kettenreaktion verwendet. Bei dieser sehr spezifischen und sensiblen Methode wird die cDNA eines spezifischen Gens über einen bestimmten Zeitraum in mehreren Zyklen amplifiziert. Nach jedem Zyklus kann die Menge an Amplifikationsprodukten durch die Verwendung spezieller qPCR-Sonden ermittelt werden. Die Menge der amplifizierten cDNA korreliert mit der Menge an ursprünglich vorhandener mRNA und ist so ein relatives Maß der Genexpression. Dieses relative Maß muss stets in Relation zu einem „Housekeeper-Gen“ gesetzt werden. Diese Gene werden möglichst nicht von äußeren Einflüssen reguliert und sollten konstant exprimiert werden. Als Referenzgen (Housekeeper) wurde von uns Hprt verwendet. Als PCR-Sonden kamen ausschließlich TaqMan Sonden zum Einsatz (siehe 3.1.7). Diese Sonden bestehen aus einer genspezifischen Sonde mit einem Reporter-Farbstoff sowie einem Quencher. Die Sonde ist ein Stück komplementärer DNA, welche aufgrund einer fehlenden freien 3'-OH Bindung von der Taq-Polymerase nicht verlängert werden kann und an die cDNA bindet. Quencher (3') und Reporter-Farbstoff (5') sind kovalent an die Sonde gebunden. Wird die Sonde mit Licht einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt, so wird der fluoreszierende Reporter-Farbstoff angeregt. Durch die räumliche Nähe zum Quencher kommt es jedoch bei intakter Sonde zum Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) von Reporter zu Quencher und somit nicht zu einer Emission von Licht. Die Taq-Polymerase ist jedoch in der Lage, bei der Amplifikation des Gens die Sonde durch ihre Exonuklease-Aktivität abzubauen. Somit kommt es zu einer dauerhaften Trennung von Quencher und Reporter-Farbstoff und der Farbstoff kann nun zur Emission angeregt werden.

Die Konzentration des Reporter-Farbstoffes und damit auch dessen Emission nimmt im selben Maße zu wie die Konzentration der Genamplifikate und kann vom PCR-System detektiert werden (life technologies, 2016). Die Messung erfolgte mit dem ViiA7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Nach einem vorbereiteten Pipettierschema wurde der nach Herstellerangaben vorbereitete Mastermix aus 5 µl/Well Kapa Probe Fast Mastermix und 0,2 µl/Well Kapa Probe Fast Rox Low mit der für das zu untersuchende Gen spezifischen TaqMan-Sonde versetzt und in die Wells einer MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate (Applied biosystems) vorgelegt. Anschließend wurde die cDNA (4,3 µl/Well) dazugegeben. Die Platte wurde kurz an zentrifugiert, mit einer Folie versiegelt und konnte nun entweder direkt im qPCR System gemessen oder lichtgeschützt bei 4°C für mehrere Stunden gelagert werden. Bei allen Proben wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Bei der sich anschließenden Auswertung wurden Proben, deren CT-Werte in der Doppelbestimmung mit einem Zyklusabstand ≥ 1 gemessen wurden, nicht berücksichtigt.

Anschließend wurde die relative Expression des Zielgens in Bezug zum Housekeeper-Gen mit folgender Formel berechnet:

$$\text{relative Expression} = \frac{1}{2^{(\Delta\text{Ct Zielgen} - \Delta\text{Ct Houskeeper})}}$$

Für eine bessere Übersichtlichkeit in der graphischen Darstellung wurde die Expression des Zielgenes in Wildtypmäusen mit 1 festgelegt, sodass die Genexpression der Cdh-5^{Δ/ΔAhr}-Mäuse als X – faches der Wildtypexpression dargestellt werden konnte.

3.2.5 Histologische Untersuchung von Leberschnitten

Für die histologische Untersuchung wurden die Lebern aus den Tieren entnommen und für 24h in 4%iger Formalinlösung fixiert. Anschließend wurden die Proben in vollentsalztem H₂O (VE-H₂O) für eine Stunde gewässert, um danach in einer aufsteigenden Alkoholreihe (20%, 40% und 70% Isopropanol, für jeweils für eine Stunde) entwässert zu werden. Danach erfolgte die Einbettung in Paraffin in der Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Die so entstandenen Paraffin-Blöcke konnten nun bis zum Anfertigen von Organschnitten bei Raumtemperatur gelagert werden.

Die Schnitte wurden mithilfe eines Mikrotoms in einer Dicke von 3 µm angefertigt und auf Objektträger aufgebracht, bevor sie über Nacht auf einer Wärmeplatte trockneten.

3.2.5.1 Hämatoxilin-Eosin Färbung

Um die Organschnitte färben zu können, wurden sie zuerst in einem Xylolbad (3-mal 3 min) entparaffiniert und anschließend mit einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (100%, 90%, 70%, 50% Ethanol danach VE-H₂O für jeweils 3 min). Jetzt erfolgte die Kernfärbung mit Hämalan nach Meyer für 10 min. Nach 2-maligem kurzem Eintauchen in VE-H₂O erfolgte das Bläuen für 15 min unter langsam fließendem Leitungswasser. Nach erneutem kurzen Eintauchen in VE-H₂O wurden die Schnitte in angesäuertem Eosin für eine Minute gegengefärbt. Abschließend erfolgte ein Waschschrift in Leitungswasser (2-maliges kurzes Eintauchen) sowie die Entwässerung der gefärbten Schnitte mithilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (2-maliges kurzes Eintauchen in 50% Ethanol, 30 s in 70% Ethanol, 1 min in 90% Ethanol, 2 mal 2 min 100% Ethanol). Nach einem erneuten Xylolbad (3 mal 3 min) wurden die Schnitte mit Eindeckmedium (Eukitt) eingedeckelt.

3.2.5.2 Sirius Rot Färbung

Um die Organschnitte färben zu können, wurden sie zuerst in einem Xylolbad (3-mal 3 min) entparaffiniert und anschließend mit einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (100%, 90%, 70%, 50% Ethanol danach VE-H₂O für jeweils 3 min). Anschließend erfolgte die Färbung in der Sirius Rot Färbelösung für 1,5h auf einem Plattformschüttler. Nach 2-maligem Waschen in 100%igem Ethanol für jeweils 30 s und einem erneuten Xylolbad (3 mal 3 min) wurden die Schnitte mit Eindeckmedium (Eukitt) eingedeckelt.

3.2.6 Immunfluoreszenz-Färbung

Um genauere Aussagen über die Zellzusammensetzung im Gewebe treffen zu können, wurden Immunfluoreszenzfärbungen auf Kryoschnitten durchgeführt. Bei der Immunfluoreszenzfärbung werden die Schnitte mit fluorochromgekoppelten Antikörpern gefärbt, die man unter einem geeigneten Mikroskop anregen und so nachweisen kann.

Dazu wurden Organproben nach ihrer Gewinnung mit Tissue Tek (Sakura) auf Trockeneis eingefroren und anschließend bis zu ihrer Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Die Schnitte wurden mithilfe eines Kryotoms (Thermo Scientific) in einer Dicke von 6 µm angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden dann entweder gefärbt oder bei -80°C gelagert. Für die Färbung wurden die Schnitte vorbereitend für 15 min in Aceton fixiert und nach dreimaligem Waschen mit PBS für 1 h mit 1%igem BSA in PBS geblockt. Über Nacht erfolgte dann die Inkubation des primären Antikörpers bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Schnitte erneut gewaschen und anschließend erfolgte die Inkubation der Sekundärantikörper in feuchtem Milieu und unter lichtgeschützten Bedingungen.

Nach Entfernung der Färbelösung durch erneutes Waschen erfolgte die Kernfärbung mit HOECHST 33258 pentahydrate (invitrogen) (1 min, 1:10.000 in PBS). Die Schnitte konnten anschließend gewaschen und mit DAKO Fluoromount eingedeckelt werden und über Nacht bei 4°C trocknen. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte bei -80°C gelagert. Die Auswertung erfolgte zeitnah um ein Verblässen der Fluorochrome zu vermeiden.

3.2.7 Messung von Transaminasen

Die Messung der Transaminasen Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) im Serum erfolgte freundlicherweise im Labor der AG Tiegs am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Dort wurden die mit H₂O verdünnten Proben mithilfe des Cobas Integra® 400 Plus (Roche Diagnostics) analysiert.

3.2.8 Behandlung mit Lipopolysaccharid

Um die Bedeutung des Ahr für die LPS-Toleranz in LSECs auch in vivo untersuchen zu können, wurde Tieren der Linie Cdh-5^{Δ/ΔAhr} 50 µg LPS / 20 g Körpergewicht (konz.: 0,25µg/µl) intraperitoneal injiziert. 20 h nach Injektion wurden die Tiere durch eine überdosierte Gabe von Narkosemittel (siehe 3.2.1) getötet. Anschließend konnten Serum und Organproben für die weiteren Analysen entnommen werden.

3.2.9 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit „Prism 5 for Mac OS X“, Version 5.0b. Der Vergleich zweier Gruppen erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test und einem 95%-Konfidenzintervall. Dabei wurde ein p-Wert <0,05 als signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der immunologischen Ahr-Funktion in sinusoidalen Leberendothelzellen (LSECs)

4.1.1 Nachweis des Ahr in LSECs

Der Ahr konnte bereits in vielen verschiedenen Geweben, unter anderem in der Leber, nachgewiesen werden (Li et al., 1994). Um den Ahr auch in LSECs nachzuweisen, wurden Leber-NPCs von Wildtypmäusen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Eine Färbung des Ahr (rot) in LSECs (CD146 positiv) zeigte eine deutlich stärkere Fluoreszenz im Vergleich zur Hintergrund- (hellgrau) und Isotypenkontrolle (dunkelgrau; Abbildung 4). Somit konnten wir nachweisen, dass der Ahr auch in LSECs exprimiert wird.

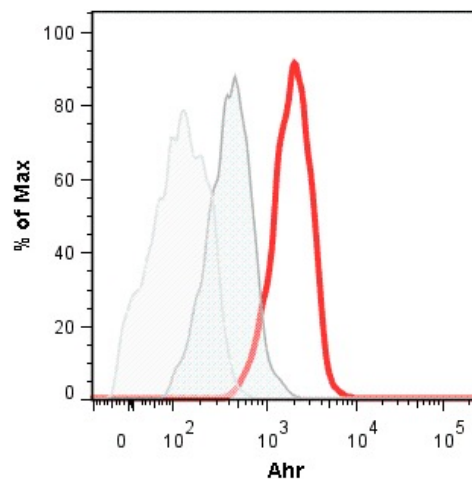


Abbildung 4: FACS-Färbung von CD146 positiven Leber-NPCs (LSEC) auf Ahr.

Die Fluoreszenzintensität des gefärbten Ahr (rot) ist deutlich stärker als die des ungefärbten Hintergrundes (hellgrau) und der Isotypenkontrolle (dunkelgrau).

4.1.2 Stimulation von LSECs mit Ahr-Liganden und Inhibitoren *in vitro*

Der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (Ahr) besitzt eine sehr polymorphe Bindungsstelle, die die Bindung unterschiedlicher, sowohl exo- als auch endogener Substanzen und Moleküle erlaubt (Nguyen and Bradfield, 2008). Abhängig von den jeweiligen Liganden können unterschiedliche Signalkaskaden aktiviert oder deaktiviert werden. Um den Einfluss von verschiedenen Liganden zu untersuchen, wurden Zellkulturexperimente mit primären LSECs aus Wildtyp-Mäusen oder Tieren mit endothelspezifischer Ahr-Defizienz durchgeführt. Die Aktivierung der Zellen erfolgte mit dem TLR4-Liganden LPS, welcher zusammen mit dem jeweiligen zu untersuchenden Ahr-Liganden (TCDD, L-Kynurenin, FICZ und ITE) oder dem Ahr-Inhibitor CH-223191 auf die Zellkultur gegeben wurde. Nach einer Inkubationszeit von 20h wurden die Zellkulturüberstände auf das Vorhandensein von anti-inflammatorischem Transforming Growth Factor β (TGF β) und von proinflammatorischem Interleukin-6 (IL-6) getestet.

4.1.2.1 LSEC-Stimulation mit TCDD

Der Ahr wurde zuerst als Rezeptor für Umwelttoxine wie das TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) entdeckt. Dass die Aktivierung des Ahr durch den exogenen Liganden TCDD auch Einfluss auf das Immunsystem nehmen kann, wurde bereits beschrieben (Quintana et al., 2008).

Es wurden $1,5 \times 10^5$ LSECs / well mit 50 ng/ml LPS stimuliert und TCDD als Ligand in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (25 nM und 100 nM) in die Zellkultur gegeben. Als Lösungsmittel für das schwer lösliche TCDD wurde auf Herstelleranweisung Toluol verwendet. Um den Einfluss des Toluols selbst zu kontrollieren, wurde in den Experimenten eine entsprechende Lösungsmittelkontrolle mitgeführt. Die Toluol-Konzentration der Lösungsmittelkontrolle war dabei äquivalent zu der in den Ansätzen mit der höchsten TCDD-Konzentration. Nach 20h wurde die Gesamtkonzentration des antiinflammatorischen Zytokins TGF- β , d.h. sowohl die latente als auch die aktive Form im Zellkulturüberstand bestimmt (Abbildung 5). Es zeigte sich eine mediane TGF- β Konzentration von 583pg/ml im Überstand der nur mit LPS stimulierten LSECs. Im Überstand der Lösungsmittelkontrolle (LPS + Toluol) fand sich eine mediane Konzentration von 559pg/ml, sodass es keinerlei signifikante Unterschiede zwischen beiden Kontrollgruppen gab ($p = 0,3429$). In den Zellkulturüberständen der LSECs, die mit 25 nM oder 100 nM TCDD behandelt wurden, fanden sich im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle tendenziell geringere TGF- β Konzentrationen (397 pg/ml bzw. 460 pg/ml). Diese Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant ($p = 0,0571$) und zeigten in Wiederholungsexperimenten erhebliche Schwankungen.

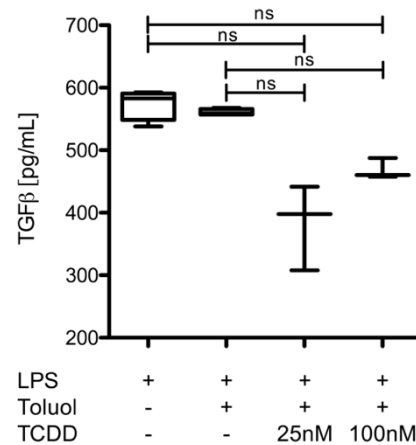


Abbildung 5: TGF- β Konzentration in Zellkulturüberständen nach 20 h Inkubation mit 50 ng/ml LPS alleine, LPS und Lösungsmittel (Toluol) oder LPS und TCDD (25 nM oder 100 nM).

Bei beiden TCDD-Konzentrationen zeigte sich eine nicht signifikante (ns) aber reduzierte TGF- β Konzentration im Vergleich zur reinen LPS- oder LPS + Toluol- Stimulation ($p = 0,0571$).

Zusätzlich wurde in ähnlichen Experimenten die Konzentration von IL-6 in den Zellkulturüberständen bestimmt (Abbildung 6). Es wurden $1,5 \times 10^5$ LSECs ausgesät und mit 10 ng/ml LPS und 50 nM TCDD bzw. Toluol stimuliert. In den Überständen der LSECs, die ausschließlich mit LPS stimuliert worden waren, zeigte sich eine mittlere IL-6 Konzentration von 257pg/ml, bei zusätzlicher Zugabe von Toluol 261pg/ml und bei LPS und TCDD-Stimulation 249pg/mg. Aus statistischer Sicht zeigten sich keinerlei Unterschiede ($p = 0,8182$).

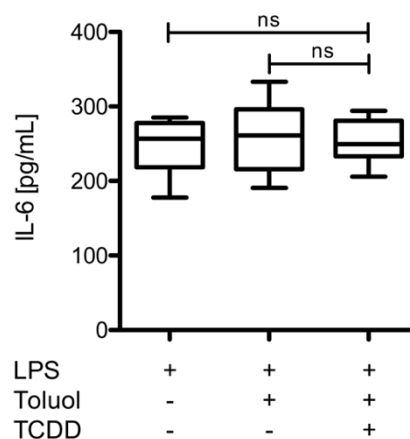


Abbildung 6: IL-6 Konzentration in Zellkulturüberständen nach 20 h Inkubation mit 10 ng/ml LPS alleine, LPS und Lösungsmittel (Toluol) oder LPS und 50 nM TCDD.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (ns).

Damit konnte gezeigt werden, dass die Ahr-Aktivierung durch TCDD weder zu einer tolerogenen (gesteigerten TGF- β Expression) noch inflammatorischen Reaktion (erhöhten IL-6 Ausschüttung) in LPS-stimulierten LSECs führte.

4.1.2.2 LSEC-Stimulation mit L-Kynurenin (β -Anthraniloyl-L-alanin)

Nach der Verwendung des exogenen Liganden TCDD erfolgten Versuche mit endogenen Ahr-Liganden. Unter anderem wurde Kynurenin als Ahr-Ligand getestet (Abbildung 7). Kynurenine sind Derivate der essenziellen Aminosäure Tryptophan und entstehen endogen beim Tryptophanabbau durch die Enzyme IDO bzw. TDO2. Kynurenine scheinen über den Ahr tolerogen zu wirken, da gezeigt wurde, dass sie die T_{Reg}-Differenzierung fördern (Mezrich et al., 2010).

Die TGF- β Konzentration nach Stimulation von LSECs ($1,5 \times 10^5$ / well), die mit LPS (50 ng/ml) und 50 μ M Kynurenin behandelt wurden, betrug 391pg/ml. Der Vergleich mit reiner LPS-Stimulation (395 pg/ml, $p = 1,00$) zeigte ebenso, wie der Vergleich mit der Lösungsmittelkontrolle (50 ng/ml LPS + HCL, 370 pg/ml, $p = 0,0571$), keine signifikante Änderung der TGF- β Konzentration.

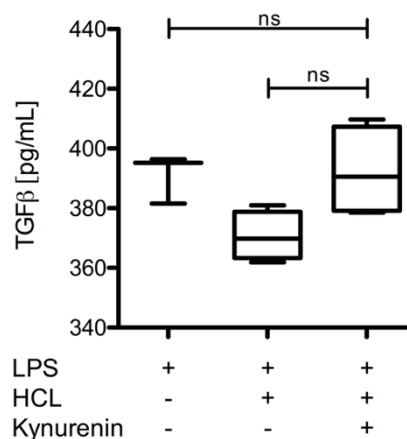


Abbildung 7: TGF- β Konzentration in Zellkulturüberständen nach 20 h Inkubation mit 50 ng/ml LPS alleine, LPS und Lösungsmittel (HCL) oder LPS und 50 μ M Kynurenin.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur LPS- ($p = 1,00$) und LPS + HCL-Stimulation ($p = 0,0571$).

Neben TGF- β wurde erneut auch IL-6 nach Kynurenin-Stimulation im Kulturüberstand von LSECs bestimmt. Auch hier ergaben sich im Vergleich zur Vehikelkontrolle keine signifikanten Unterschiede ($p = 1,00$; Abbildung 8).

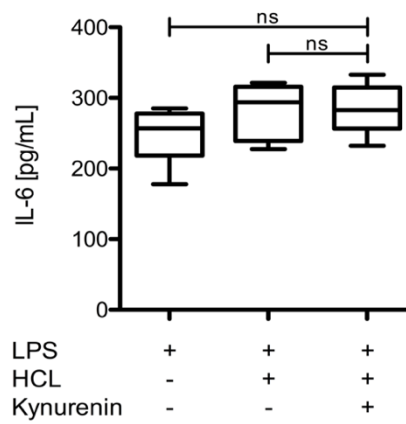


Abbildung 8: IL-6 Konzentration in Zellkulturüberständen nach 20 h Inkubation mit 10 ng/ml LPS alleine, LPS und HCL oder LPS und 50 μ M Kynurenin.

Es zeigten sich keinerlei signifikanten Unterschiede (ns).

Unsere Experimente zeigen, dass die Ahr-Aktivierung durch Kynurenin in LSECs die LPS-induzierte Zytokinproduktion nicht zu beeinflussen schien.

4.1.2.3 LSEC-Stimulation mit FICZ (5,11-Dihydroindolo[3,2-b]carbazole-6-carboxaldehyde)

Zusätzlich zu den beiden Liganden TCDD und Kynurenin (4.1.2.1 und 4.1.2.2) erfolgte auch die Untersuchung des Ahr-Liganden FICZ (Abbildung 9). FICZ ist ebenfalls ein Tryptophan-derivat und entsteht durch Photokonversion in der Haut.

Abhängig vom jeweiligen Kontext kann die Ahr-Aktivierung durch FICZ entweder zu einer Reduktion oder Steigerung der Entzündungsreaktion führen (Quintana and Sherr, 2013). Wie bereits für die anderen Liganden beschrieben, wurden LSECs ($1,5 \times 10^5$ / well) mit 10ng/ml LPS für 20 h stimuliert. Zusätzlich wurde entweder 100 mM FICZ oder DMSO als Lösungsmittel zugegeben. Bei der Messung von IL-6 im Zellkulturüberstand zeigte sich, dass die Aktivierung von Ahr durch FICZ, verglichen mit einer reinen LPS-Stimulation der LSECs, zu einer signifikant geringeren IL-6 Produktion (199 pg/ml vs. 257 pg/ml; $p = 0,0411$) führte. Auch im Vergleich mit der zugehörigen Lösungsmittelkontrolle (256 pg/ml) zeigte sich eine signifikante Reduktion der IL-6 Konzentration ($p = 0,0411$). Daraus lässt sich schließen, dass die Aktivierung des Ahr durch FICZ, anders als durch die oben beschriebenen Liganden TCDD und Kynurenin, eine antiinflammatorische Wirkung in LSECs zu haben schien.

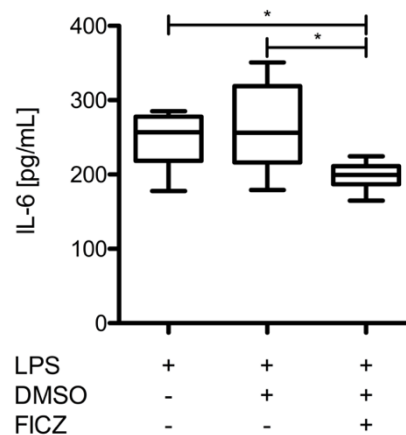


Abbildung 9: IL-6 Konzentration in Zellkulturüberständen nach 20 h Inkubation mit 10 ng/ml LPS, LPS und DMSO oder LPS und 100 mM FICZ.

Es zeigte sich, dass der Ligand die IL-6 Konzentration im Vergleich zur reinen LPS Stimulation, sowie zur LPS + Lösungsmittel-Stimulation signifikant reduzierte ($p = 0,0411$).

4.1.2.4 LSEC-Stimulation mit ITE (2-(1H-Indol-3-ylcarbonyl)-4-thiazolecarboxylicacidmethylester)

Für den endogenen Ahr-Liganden ITE wurde ebenfalls eine tolerogene Wirkung sowohl in T-Zellen, als auch in APCs beschrieben (Quintana et al., 2010).

Die Wirkung von ITE auf die Immunfunktion von LSECs wurde analog zu den anderen Ahr-Liganden getestet. Hierzu wurden $1,5 \times 10^5$ LSECs / well mit unterschiedlichen Konzentrationen LPS für 20 h stimuliert. Ergänzend wurden den Zellen entweder verschiedene Konzentrationen ITE oder die äquivalent benötigte Menge an DMSO als Lösungsmittelkontrolle zugesetzt. Generell zeigte sich in allen Versuchen ein ähnlicher Trend: Die Verwendung von ITE als Ligand sorgte für eine Reduktion der IL-6 Konzentration in den Zellkulturüberständen LPS-stimulierter LSECs.

In den ersten Versuchen wurde eine Konzentration von 10 ng/ml LPS zur LSEC-Stimulation eingesetzt (Abbildung 10). In einem repräsentativen Versuch zeigte sich die IL-6 Produktion der mit 100 nM ITE behandelten LSECs im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle signifikant reduziert (224,81 pg/ml vs. 308,03 pg/ml; $p = 0,0286$). Der Vergleich mit der reinen LPS-Simulation (278,96 pg/ml; $p = 0,0571$) zeigte eine starke Tendenz, war aber nicht signifikant. Die Reduktion der IL-6 Produktion durch ITE verglichen zur LPS-Stimulation als auch zur Lösungsmittelkontrolle ließ sich für verschiedene ITE-Konzentrationen beobachten und reproduzieren (50 - 200nM; nicht dargestellt).

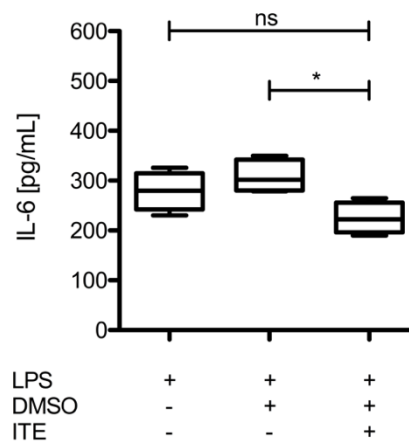


Abbildung 10: IL-6 Konzentration in Zellkulturüberständen nach 20 h Inkubation mit 10 ng/ml LPS, LPS und Lösungsmittel (DMSO) oder LPS und 100nM ITE.

Repräsentatives Ergebnis aus drei durchgeführte Experimenten.

Es zeigte sich, dass der Ligand die IL-6 Konzentration im Vergleich zur reinen LPS-, als auch zur LPS + Lösungsmittel-Stimulation tendenziell (LPS / 100 nM ITE $p = 0,0571$), bzw. signifikant (LPS + DMSO /100 nM ITE $p = 0,0286$) reduzierte.

ns = nicht signifikant

Auch bei einer Aktivierung der LSEC mit einer 5-fach erhöhten LPS-Dosis (50 ng/ml) (Abbildung 11) ließ sich die initiale Beobachtung, dass ITE in der Lage ist, die IL-6 Expression von LPS-stimulierten LSECs zu reduzieren, bestätigen.

Bei der Verwendung von 200 nM senkte ITE die IL-6 Produktion von LPS-stimulierten LSECs im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle signifikant (462,71 pg/ml vs. 314,37 pg/ml; $p = 0,0286$). Der Vergleich zur reinen LPS-Stimulation (413,47 pg/ml; $p = 0,0571$) zeigte eine starke Tendenz, jedoch keinen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$). In diesen Versuchen war der hier dargestellte Effekt, wie bei der geringeren LPS Konzentration, über verschiedene ITE-Konzentrationen (50 – 200nM) reproduzierbar.

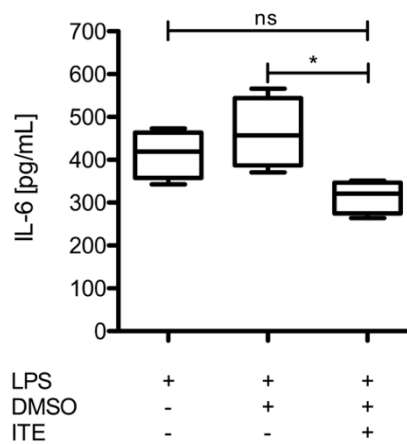


Abbildung 11: IL-6 Konzentration in Zellkulturüberständen nach 20 h Inkubation mit 50 ng/ml LPS, LPS und DMSO oder LPS und ITE (200 nM).

Einzelversuch.

Es zeigte sich, dass ITE die IL-6 Konzentration im Vergleich zur reinen LPS-, als auch zur LPS + Lösungsmittel-Stimulation tendenziell (LPS / 200 nM ITE $p = 0,0571$) bzw. signifikant (LPS+ DMSO / 200 nM ITE $p=0,0286$) reduziert.

ns = nicht signifikant

4.1.2.5 LSEC-Stimulation mit einem Ahr-Inhibitor (CH-223191)

Um weiter zu untersuchen, ob die Zytokinantwort der LSECs Ahr-abhängig ist, wurde zusätzlich zu den oben beschriebenen Versuchen mit den aktivierenden Ahr-Liganden auch der Ahr-Inhibitor CH-223191 verwendet.

Die LSECs ($1,5 \times 10^5$ / well) wurden mit LPS (10 ng/ml) aktiviert und mit Ahr-Inhibitor oder DMSO als Vehikelkontrolle stimuliert. In unseren Versuchen wurde die IL-6 Konzentration im Zellkulturüberstand durch die Zugabe von verschiedenen Ahr-Inhibitor-Konzentrationen (20µM – 50µM) verringert.

Abbildung 12 zeigt dabei repräsentativ, wie verglichen mit der reinen LPS-Stimulation (469,7 pg/ml; $p = 0,0286$) und der Lösungsmittelkontrolle (384,7 pg/ml; $p = 0,0286$), die eingesetzte Inhibitorkonzentration von 30 µM zu einer signifikanten Reduktion der IL-6 Konzentration im Zellkulturüberstand führte (269,4 pg/ml). Diese Reduktion der IL-6 Konzentration konnten wir in mehreren Versuchen und mit unterschiedlichen Inhibitor-Konzentrationen beobachten. Da auch die Aktivierung des Ahr durch die Ahr-Agonisten FICZ oder ITE eine Suppression der IL-6 Produktion bewirkte, entspricht dieses Ergebnis nicht unserer Erwartung. Die widersprüchlichen Ergebnisse lassen sich möglicherweise damit erklären, dass der Inhibitor nicht wie beschrieben (Kim et al., 2006) antagonistisch, sondern in den verwendeten Konzentrationen möglicherweise agonistisch wirkte.

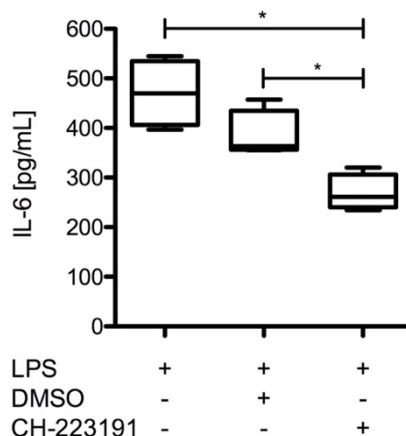


Abbildung 12: IL-6 Konzentration in Zellkulturüberständen nach 20 h Inkubation mit 10 ng/ml LPS, LPS und Lösungsmittel (DMSO) oder LPS und 30 µM des Ahr-Inhibitors CH-223191.

Repräsentativer Einzelversuch.

Es zeigte sich, dass der Inhibitor die IL-6 Konzentration im Vergleich zur reinen LPS- als auch zur LPS + Lösungsmittel-Stimulation signifikant (LPS + DMSO / 30 µM Inhibitor $p = 0,0286$; LPS / 30 µM Inhibitor $p = 0,0286$) reduzierte.

ns = nicht signifikant

Zusammenfassend zeigten einige der hier getesteten Ahr-Liganden eine hemmende Wirkung auf die IL-6 Antwort von sinusoidalen Leberendothelzellen nach LPS Stimulation, während andere Liganden zumindest in den verwendeten Konzentrationen keinen Effekt zeigten. Insbesondere ITE war in verschiedenen Konzentrationen in der Lage, die proinflammatorische IL-6 Expression zu reduzieren, auch bei verschieden starken LPS-Stimulationen. Während auch FICZ in der Lage zu sein scheint, die IL-6 Antwort zu supprimieren, konnten diese Effekte bei TCDD und Kynurenin nicht von uns beobachtet werden. Da hier jedoch keine höheren Liganden-Konzentrationen getestet wurden, ist dies möglicherweise auf eine zu niedrige Ahr Stimulation zurückzuführen. Eine alternative Erklärung für die fehlende Wirksamkeit von TCDD und Kynurenin könnte aber auch eine möglicherweise unterschiedliche Stimulation des Ahr durch die jeweiligen Liganden sein. Unklar bleibt auch, warum der Ahr Inhibitor ebenso wie die wirksamen Liganden eine reduzierte IL-6 Freisetzung bewirkte. Auch hier könnte möglicherweise die eingesetzte Konzentration des Inhibitors eine Rolle spielen. In weiterführenden Untersuchungen sollte daher eine Dosis-Wirkungs-Beziehung sowohl für den Inhibitor als auch für die hier unwirksamen Liganden TCDD und Kynurenin ermittelt werden.

4.1.3 Stimulation Ahr-defizienter LSECs *in vitro*

Um die Auswirkungen eines Ahr-Defizites in den LSECs, unabhängig von einem chemischen Inhibitor und den damit einhergehenden Schwierigkeiten (siehe 4.1.2.5), in der Zellkultur untersuchen zu können, wurden LSECs der Mauslinie $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ verwendet. Diesen konditionalen Knockout-Mäusen fehlt der Ahr spezifisch in allen Endothelzellen und damit auch in den sinusoidalen Endothelzellen der Leber (siehe 3.1.8). Zu Vergleichszwecken wurden Zellen von Wurfgeschwistern (littermates, $Ahr^{fl/fl}$; vgl. 3.1.8) verwendet.

Für den Versuch wurden jeweils LSECs aus $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ und $Ahr^{fl/fl}$ Mäusen isoliert und in Kultur genommen. Um eine vergleichbare Zelldichte in den Ansätzen zu bekommen, wurden die LSECs der Wurfgeschwister mit intaktem Ahr in einer Konzentration von $1,5 \times 10^5$ Zellen / well und die $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ LSECs in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen / well ausgesät, da die Ahr-defizienten LSECs empfindlicher gegenüber dem Isolationsstress waren. Zudem war die Zellausbeute bei Mäusen, denen der Ahr in den Endothelzellen fehlte, reduziert. Am nächsten Tag wurden die Kulturen mit 10 ng/ml LPS für 20 h stimuliert. Anschließend wurde die IL-6 Konzentration in den Zellkulturüberständen gemessen.

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ($p = 0,0007$; Abbildung 13). Während die mittlere IL-6 Konzentration bei Ahr-exprimierenden LSECs 36,82 pg/ml betrug, lag diese mit 183,78 pg/ml bei den Ahr-defizienten Zellen bei fast der 5-fachen Konzentration. Es lässt sich daher sagen, dass das Fehlen des Ahr während einer Stimulation der Zellen mit LPS die Zellen dazu veranlasste, mehr IL-6 zu produzieren.

Diese Experimente zeigen, dass Ahr in LSECs für die Hemmung der LPS-induzierten IL-6 Antwort wichtig zu sein scheint und damit zur Toleranz gegenüber LPS beiträgt.

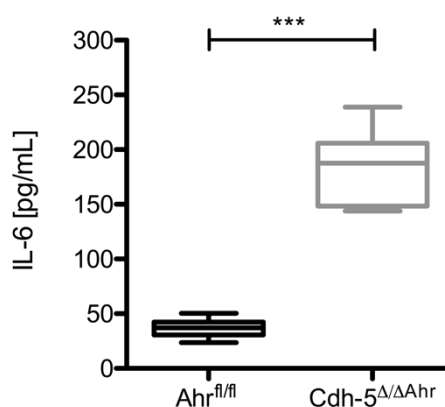


Abbildung 13: IL-6 Konzentrationen von LPS (10 ng/ml) stimulierten LSECs.

Es zeigt sich das LSECs die den Ahr exprimieren ($Ahr^{fl/fl}$) signifikant ($p = 0,0007$) weniger IL-6 (36,82 pg/ml) produzieren als Ahr-defiziente LSECs (183,78 pg/ml).

In unseren *in vitro* Experimenten konnten wir beispielhaft für IL-6 zeigen, dass eine Aktivierung des Ahr mit den Liganden FICZ oder ITE eine LPS-induzierte pro-entzündliche Zytokinantwort in LSECs hemmen kann (siehe Abbildung 10 - 11). Da die Ahr-defizienten LSECs auf LPS-Stimulation mit einer deutlich erhöhten IL-6 Produktion reagierten, konnten wir die tolerogene Rolle des Ahr bei LPS-Aktivierung der LSECs weiter bestätigen. Im Folgenden wurde die funktionelle Rolle des Ahr in Endothelzellen im Rahmen der LPS-Toleranz *in vivo* untersucht.

4.2 Bedeutung des Ahr für die Etablierung von LPS-Toleranz *in vivo*

Intrahepatisch sind LSECs in der Lage, bei wiederholter LPS-Exposition ihre IL-6 Antwort zu reduzieren (Uhrig et al., 2005). Nachdem die Ergebnisse der *in vitro* Experimente zeigten, dass der Ahr eine Rolle bei der immunologischen Antwort der LSECs auf eine Stimulation mit LPS spielt, wurde nun die Rolle des Ahr in Endothelzellen für die Etablierung der LPS-Toleranz *in vivo* untersucht.

Es wurde weiblichen Mäusen im Alter zwischen 9 und 13 Wochen der Linie $Cdh-5^{\Delta/\Delta} Ahr$ gewichtsadaptiert (50 µg LPS / 20 g Körpergewicht) eine intraperitoneale LPS-Injektion verabreicht. Als Kontrolle dienten erneut Wurfgeschwister ($Ahr^{fl/fl}$).

Nach 20 h wurde die Leberschädigung anhand der Transaminasen Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) im Mausserum bestimmt (Abbildung 14). Da beide Enzyme unter physiologischen Bedingungen intrazellulär zu finden sind, spricht ihre Erhöhung, vor allem die der in Hepatozyten hoch konzentrierten ALT, für den Untergang von Hepatozyten. Die Messung beider Enzyme zeigte, dass sowohl die behandelten Wurfgeschwister (ALT 202 U/L; AST 382 U/L), als auch die Ahr-defizienten Mäuse (ALT 182 U/L; AST 476 U/L) erhöhte Serumtransaminasen aufzeigten. Allerdings lagen die gemessenen Konzentrationen von ALT und AST in beiden Gruppen auf einem ähnlichen Niveau, sodass man keinen signifikanten Unterschied zwischen $Ahr^{fl/fl}$ - und $Cdh-5^{\Delta/\Delta} Ahr$ -Mäusen ausmachen konnte (ALT $p = 0,2593$; AST $p = 0,7489$).

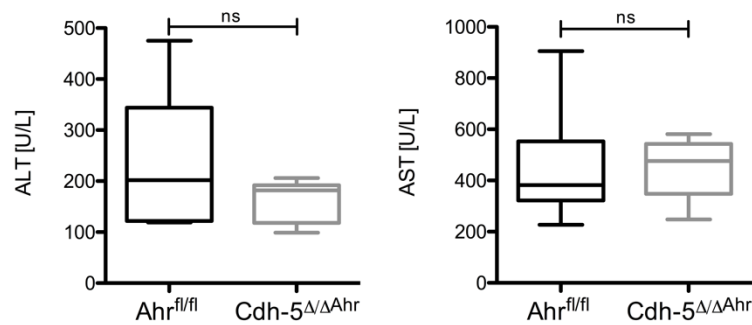


Abbildung 14: Serumtransaminasen von mit LPS behandelten Ahr-defizienten Mäusen ($Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$) und ihren Wurfgeschwistern ($Ahr^{fl/fl}$).

Es zeigten sich weder bei den ALT- ($p = 0,2593$) noch bei den AST-Konzentrationen im Serum ($p = 0,7489$) signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

ns = nicht signifikant

LPS-Behandlung: $50 \mu\text{g}$ LPS / 20 g Körpergewicht, konz.: $0,25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$; intraperitoneal.

Die Bestimmung des proinflammatorischen Zytokins IL-6 im Serum zeigte, im Gegensatz zu den Transaminasen, signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Die gepoolten Daten aus zwei Experimenten zeigten, dass die mittleren Serum-IL-6 Konzentration in Mäusen, denen der Ahr in ihren Endothelzellen und damit auch in ihren LSECs fehlte ($n = 10$; $980,54 \text{ pg/ml}$), im Vergleich zu Kontrollmäusen mit Ahr im Endothel ($n = 9$; $304,4 \text{ pg/ml}$) signifikant erhöht war ($p = 0,0057$; Abbildung 15).

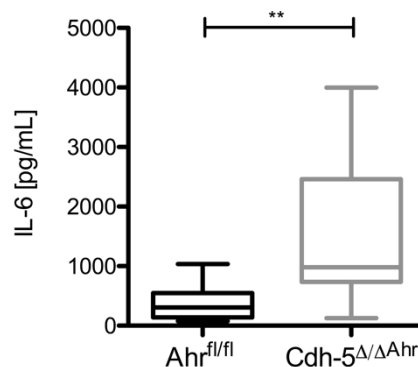


Abbildung 15: Serum IL-6 Konzentration von $Ahr^{fl/fl}$ und $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ Mäusen 20 h nach LPS-Gabe

Kombination aus zwei Einzelversuchen. Es zeigte sich, dass ein Fehlen des Ahr im Endothel zu signifikant höheren Serum IL-6 Konzentrationen führte ($p = 0,0057$).

LPS-Behandlung: $50 \mu\text{g}$ LPS / 20 g Körpergewicht, konz.: $0,25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$; intraperitoneal.

Um die Expression des proentzündlichen Zytokins IL-6 auf RNA-Ebene direkt in der Leber zu beurteilen, wurde die komplementäre DNA mittels qPCR analysiert (Abbildung 16). Übereinstimmend mit den erhöhten IL-6 Serumspiegeln, zeigte sich auch die IL-6 Expression in Gesamtlebergewebe von $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ Mäusen signifikant erhöht ($p = 0,0086$). Verglichen mit der Expression des Zytokins in $Ahr^{fl/fl}$ -Mäusen, war die relative Expression von IL-6 um mehr als das 4-fache gesteigert ($p = 0,0086$).

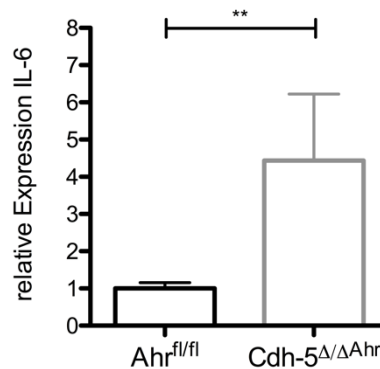


Abbildung 16: Relative Expression von IL-6 in Lebergewebe von $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ - im Vergleich zu $Ahr^{fl/fl}$ -Mäusen nach LPS-Behandlung.

Passend zu den Beobachtungen im Serum sieht man, dass die Expression von IL-6 in $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Mäusen mehr als das 4-fache gesteigert ist ($p = 0,0086$).

Gemeinsam mit den *in vitro* Befunden, die zeigen, dass die Aktivierung des Ahr eine LPS-induzierte IL-6 Antwort in LSECs hemmt (s.o.), deuten auch die *in vivo* Daten darauf hin, dass Ahr in LSECs eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung von hepatischer LPS-Toleranz spielt.

Neben Transaminasen und IL-6 im Serum wurden auch die nicht parenchymatösen Zellen (NPC) der Leber der LPS-behandelten Tiere genauer untersucht. Dazu wurden die NPCs der Tiere isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die NPCs wurden vor allem im Hinblick auf ihre Zusammensetzung (Abbildung 17) sowie die Ausprägung von immunologisch relevanten Molekülen auf den LSECs analysiert (Abbildung 18).

Die Färbung von CD11c (v.a. DCs, Abbildung 17a) und CD146 (LSECs, Abbildung 17b) zeigte, dass sich der prozentuale Anteil der jeweiligen Zellpopulation in den beiden Genotypen $Ahr^{fl/fl}$ (CD11c⁺ 13,4 %; CD146⁺ 22,1 %) und $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ (CD11c⁺ 13,9 %; CD146⁺ 19,5 %) nicht signifikant unterschied (CD11c⁺ $p = 0,2769$; CD146⁺ $p = 0,5350$).

Interessanterweise zeigte sich jedoch eine $CD11c^+ / CD146^+$ doppelt positive Zellpopulation (Abbildung 17c), die bei Mäusen mit Ahr-defizientem Endothel (16,4 %) im Vergleich zu Tieren ohne Ahr-Defizit (10,8 %) signifikant größer war ($p = 0,0023$). Der Ursprung dieser Zellpopulation und deren spezifischen Eigenschaften sind aktuell noch nicht bekannt und sollen daher weiter untersucht werden.

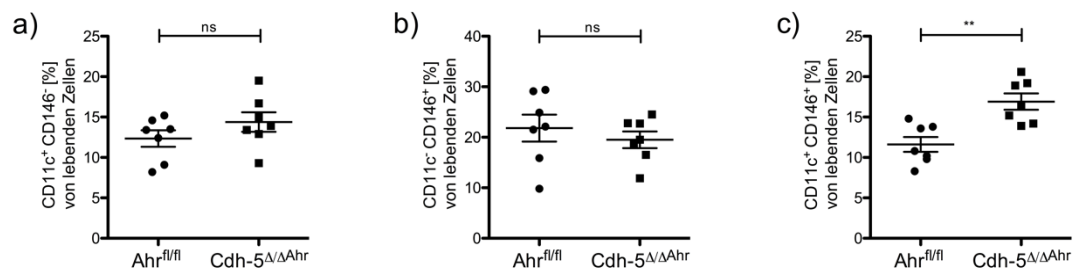


Abbildung 17: Statistische Auswertung der Färbung von $CD11c^+ CD146^-$ (a), $CD11c^- CD146^+$ (b) und $CD11c / CD146$ doppelt positiven (c) lebenden Leber-NPCs.

Es zeigte sich, dass sich die Zellpopulationen von $CD11c^+ CD146^-$ (v.a. DCs, $p = 0,2769$) sowie $CD11c^- CD146^+$ (LSECs, $p = 0,5350$) in beiden Genotypen ($Ahr^{fl/fl}$ bzw. $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$) nicht signifikant unterschieden. Die Population der $CD11c / CD146$ doppelt positiven Zellen war jedoch in Mäusen mit Ahr-defizientem Endothel ($Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$) signifikant erhöht ($p = 0,0023$).

ns = nicht signifikant

Um eine Aussage über die Expression von immunologisch relevanten Oberflächenmolekülen auf LSECs (gated auf $CD146^+$ Zellen) treffen zu können, wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) dieser Moleküle bestimmt (Abbildung 18). Die MFI korreliert mit der Anzahl der gebundenen Fluorochrome und kann damit als Maß für die Expressionsdichte der Moleküle angesehen werden. Es fiel auf, dass vor allem der Major Histocompatibility Complex II (MHC II (I-Ad und I-Ed), Abbildung 18a), welcher der Antigenpräsentation gegenüber $CD4^+$ T Zellen dient sowie das ko-stimulatorische Molekül CD86 (Abbildung 18b) in den $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ Mäusen hochreguliert waren. Bei MHC II ($Ahr^{fl/fl}$ MFI = 607; $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ MFI = 832) handelte es sich um eine tendenzielle (MHC II $p = 0,0728$), bei CD86 ($Ahr^{fl/fl}$ MFI = 279; $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ MFI = 383) um eine signifikante Erhöhung ($p = 0,0041$). Das ko-stimulatorische Molekül CD80 (Abbildung 18c) zeigte dagegen keinen signifikanten Unterschied zwischen $Ahr^{fl/fl}$ - und $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ - Mäusen (519 vs. 538; $p = 0,4557$).

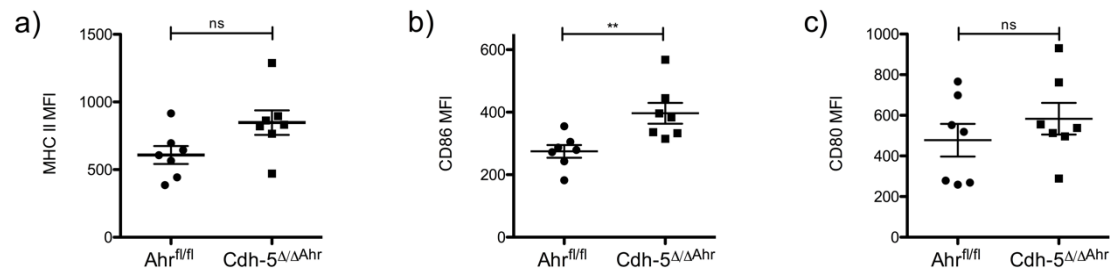


Abbildung 18: Statistische Auswertung der für die T-Zell-Aktivierung wichtigen Moleküle MHC II (a), CD86 (b) und CD80 (c) auf LSECs (CD146⁺).

Es zeigte sich, dass die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von MHC II tendenziell ($p = 0,0728$) und CD86 signifikant ($p = 0,0041$) höher war. Bei der CD80-Expression gab es keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,4557$).

ns = nicht signifikant

Neben den zur T-Zell-Stimulation notwendigen Oberflächenmolekülen wurde auch nach Unterschieden im T-Zell Kompartiment (T_H1 -, T_H2 -, T_{Reg} - und NKT-Zellen) geschaut. Hier fanden sich jedoch keine signifikanten Unterschiede, was am ehesten durch den eher frühen Zeitpunkt in der Immunantwort der Tiere (nach 20 h) begründet werden kann (nicht gezeigt).

Die gesteigerte Expression von MHC II und CD86 in Cdh-5^{Δ/Δ}Ahr-Mäusen als Antwort auf eine LPS-Stimulation *in vivo* spricht dafür, dass Ahr nicht nur für die Regulation der Zytokinausschüttung (IL-6) verantwortlich ist, sondern auch die Eigenschaften der LSECs als Antigen-präsentierende Zellen der Leber beeinflusst. So könnte ein Fehlen des Ahr in LPS-aktivierten LSECs über die vermehrte Expression von MHC II und CD86 auch Einfluss auf die T-Zell-Aktivierung durch LSECs haben.

4.3 Phänotypische Merkmale von Mäusen der Linie Cdh-5^{Δ/ΔAhr}

In den durchgeführten Experimenten fiel auf, dass das Fehlen des Ahr in Endothelzellen zu speziellen phänotypischen Veränderungen in den Cdh-5^{Δ/ΔAhr}-Mäusen führte. Diese wurden im Folgenden genauer untersucht.

4.3.1 Makroskopischer Phänotyp

Bei der Präparation der Mäuse fiel auf, dass die Portalvene (V. portae) von Cdh-5^{Δ/ΔAhr}-Mäusen verglichen mit der von Ahr^{fl/fl}-Mäusen deutlich voluminöser und prominenter erschien. Während die V. porta der Ahr^{fl/fl}-Maus im Verhältnis zur unteren Hohlvene (V. cava) einen deutlich reduzierten Durchmesser aufwies, zeigte die V. portae der Cdh-5^{Δ/ΔAhr}-Maus ein ähnliches Kaliber wie die V. cava (Abbildung 19).

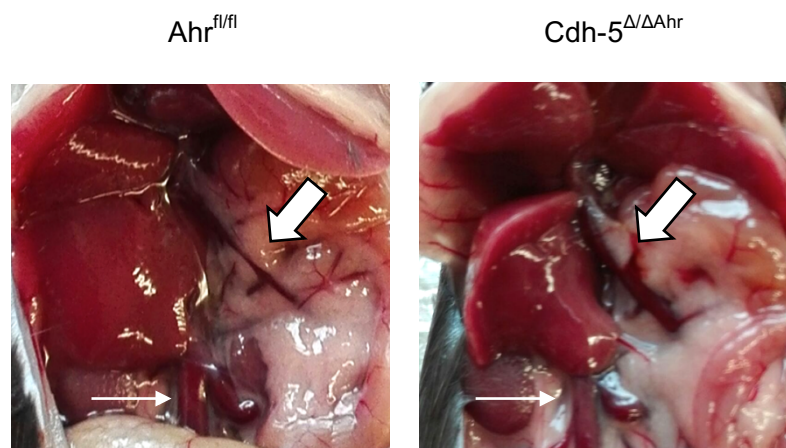


Abbildung 19: V. portae und V. cava in situ von Ahr^{fl/fl}- und Cdh-5^{Δ/ΔAhr}-Mäusen.

Die Pfortader (Blockpfeil) schien bei Fehlen des Ahr im Endothel (Cdh-5^{Δ/ΔAhr}, rechts) deutlich größer zu sein als bei endothelialer Ahr-Expression (Ahr^{fl/fl} links). Als Reverenz dient die V. cava inferior (Pfeil).

Um diesen Eindruck zu objektivieren, wurden die Durchmesser von V. portae und V. cava der verschiedenen Genotypen ausgemessen und ein Quotient gebildet (Abbildung 20). Sowohl bei den Wurfgeschwistern (Ahr^{fl/fl}) als auch bei den VE-CRE-Mäusen (Expression der Cre-Rekombinase unter dem Promoter von Cdh-5) als weiterer Kontrolle, zeigte sich ein mittleres V. portae / V. cava - Verhältnis von ca. 0,5 (Ahr^{fl/fl}: 0,58; VE-CRE: 0,53). Dagegen war das V. portae / V.cava - Verhältnis in Cdh-5^{Δ/ΔAhr}-Mäusen (0,8875) signifikant erhöht (p = 0,0294).

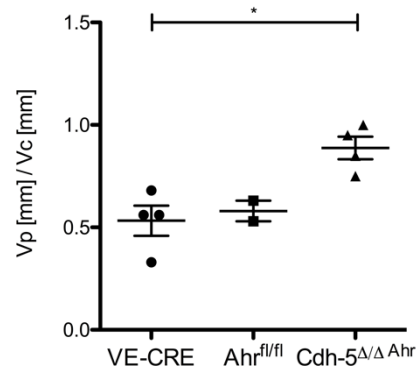


Abbildung 20: Relatives Verhältnis der Gefäßdurchmesser.

Es zeigt sich, dass das Verhältnis von *V. portae* zu *V. cava* in *Cdh-5^{Δ/ΔAhr}*-Mäusen signifikant höher ist ($p = 0,0294$) als in den beiden Kontrollgruppen (*VE-CRE* und *Ahr^{fl/fl}*).

Betrachtete man zusätzlich noch die Mesenterialgefäße (Abbildung 21), so sah man auch hier, dass das Fehlen des *Ahr* in Endothelzellen zu einer stärkeren Gefäßausprägung führte. Vor allem die Hauptgefäße erschienen in den *Cdh-5^{Δ/ΔAhr}*-Mäusen deutlich kräftiger als in den *Ahr^{fl/fl}*-Mäusen.

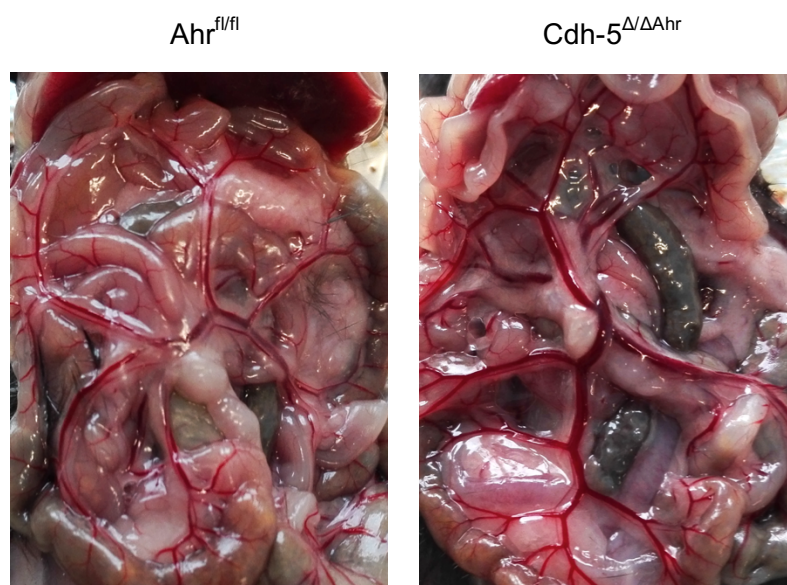


Abbildung 21: Mesenterialgefäße in situ von *Ahr^{fl/fl}*- (links) und *Cdh-5^{Δ/ΔAhr}*-Mäusen (rechts). Gefäße ohne endotheliale *Ahr*-Expression erschienen deutlich stärker ausgeprägt.

Neben den Veränderungen der Mesenterialgefäße fiel des Weiteren noch ein Größenunterschied der Milzen auf (Abbildung 22). Im direkten Vergleich erschienen die Milzen der $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Mäuse größer. Zusätzlich ließen sich intraperitoneal geringe Flüssigkeitsmengen im Sinne eines Aszites beobachten.

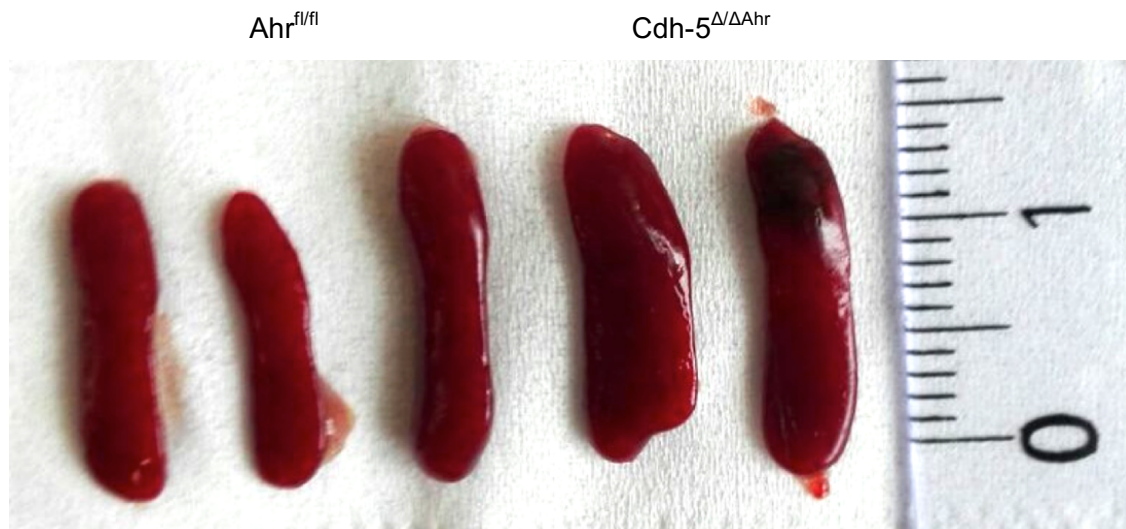


Abbildung 22: Milzen von $Ahr^{fl/fl}$ - (links) und $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Mäusen (rechts) im direkten Vergleich. Die Milzen der $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Mäusen sind ca. 2-3 mm länger und breiter.

Zusammenfassend waren makroskopisch in den Mäusen der Linie $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ vor allem vaskuläre Veränderungen sowie ein Aszites und eine Splenomegalie auffällig. Die Gefäßerweiterung von Pfortader und Mesenterialgefäßen könnte dabei für einen reduzierten Blutabfluss durch die Leber sprechen. Eine solche Abflussbehinderung in Kombination mit einem Aszites sowie einer Splenomegalie erinnern dabei stark an Veränderungen, die als Folge einer portalen Hypertension (PHT) beobachtet werden können.

Um einen Überblick über die Gefäßverhältnisse der Lebern zu bekommen, wurden ganze Lebern entnommen und in 4 %iger Formaldehydlösung fixiert. Die fixierten Organe wurden in einzelne Lappen aufgeteilt und dann die Gefäßversorgung in Kooperation mit J. Dieckhoff (Radiologie, UKE) mittels Magnetresonanztomographie (MRT) dargestellt und verglichen (Abbildung 23). Betrachtet man die Gefäße der $Ahr^{fl/fl}$ -Maus (oben) erkennt man einen sich regelmäßig verzweigenden, physiologischen Gefäßbaum. Im Vergleich dazu, zeigen die Gefäße der $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Maus (unten) deutlich weniger Verzweigungen. Von den Stammgefäßen zweigen einzelne, kräftige Gefäße ab, die weitere Verästelung des Gefäßbaumes ist jedoch deutlich reduziert bis kaum vorhanden.

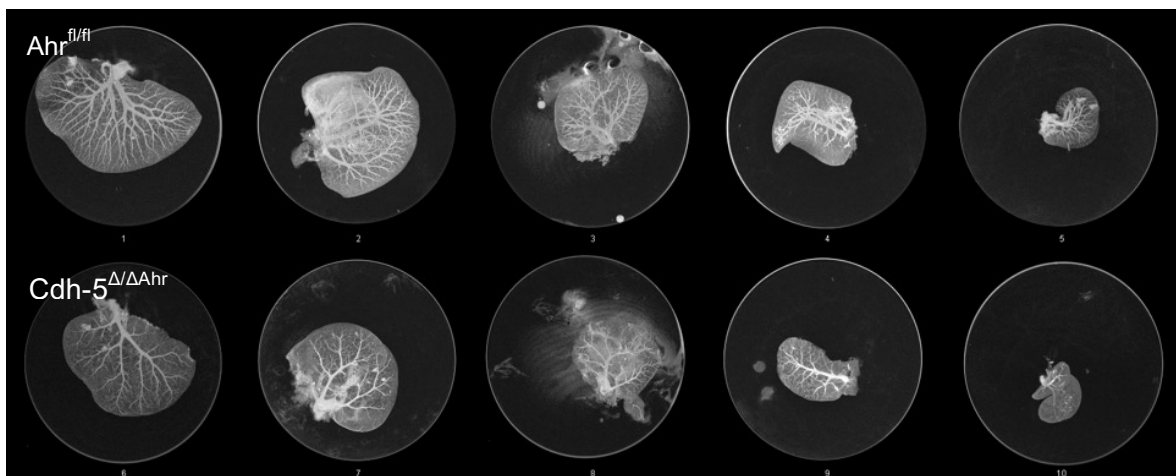


Abbildung 23: MRT-graphische Darstellung der Gefäße der einzelnen Leberlappen einer $Ahr^{fl/fl}$ - (oben) und einer $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Maus (unten).

Während sich die Gefäße der $Ahr^{fl/fl}$ -Maus physiologisch verzweigen zeigt die $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Maus eine deutlich reduzierte bis fehlende Verästelung vor allem der kleinen Gefäße. Die Daten wurden in Kooperation mit J. Dieckhoff (Diagnostische und Interventionelle Radiologie, UKE) erhoben.

4.3.2 Mikroskopischer Phänotyp

Ein weiterer Unterschied ließ sich in der Mikroanatomie der Lebern ausmachen. In histologischen Schnitten der $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Mäuse fielen Veränderungen im Bereich der Glisson-Trias (V. interlobularis (Pfortaderast), A. interlobularis (Ast der A. hepatica propria), Ductus biliferi interlobulares (interlobulärer Gallengang)) auf (Abbildung 24). In der HE-Färbung der Lebern wirkten die Gefäßwände in diesen Bereichen verdickt und die Gefäße an sich vermehrt. Parallel dazu war die Zellkerndichte rund um die Gefäße deutlich erhöht. Ob es sich dabei um ein entzündliches Infiltrat oder eine Hyperplasie der Gefäße handelte, ließ sich anhand der HE-Färbung nicht sicher beurteilen.

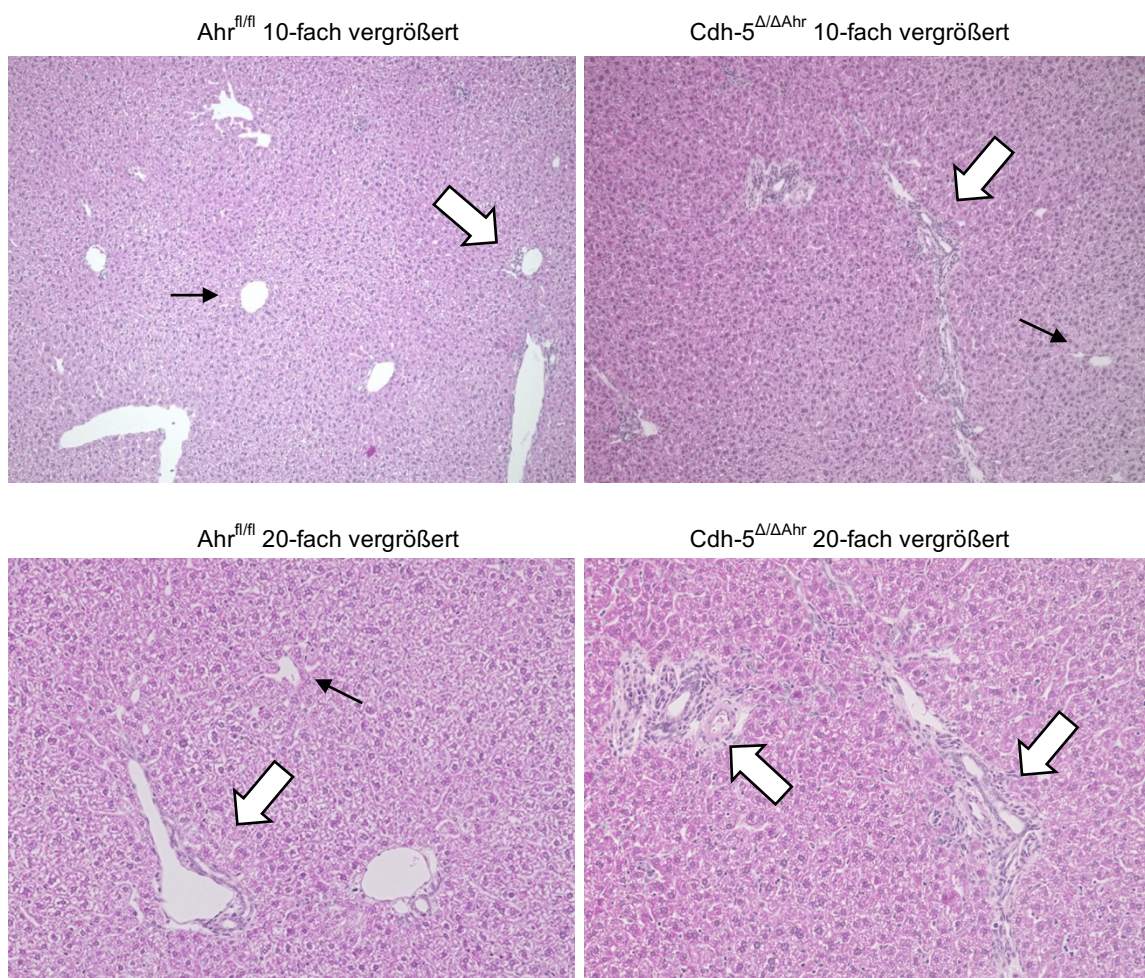


Abbildung 24: HE-Färbung von Leberschnitten von $Ahr^{fl/fl}$ - (links) und $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Mäusen (rechts). 10- und 20-fach vergrößert. Die Gefäßwände im Bereich der Glisson-Trias (dicke, weiße Pfeile) in $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Mäusen wirkten deutlich verdickt und die Gefäße vermehrt. Des Weiteren fiel eine erhöhte Zellkerndichte um die Gefäße auf. Um die Zentralvenen konnte man keine Unterschiede feststellen (schmale schwarze Pfeile).

In der Sirius Rot-Färbung konnte man deutlich erkennen, dass sich im Bereich der Gefäßwände in der Glisson-Trias von $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Mäusen deutlich mehr rot angefärbtes Kollagen befand (Abbildung 25).

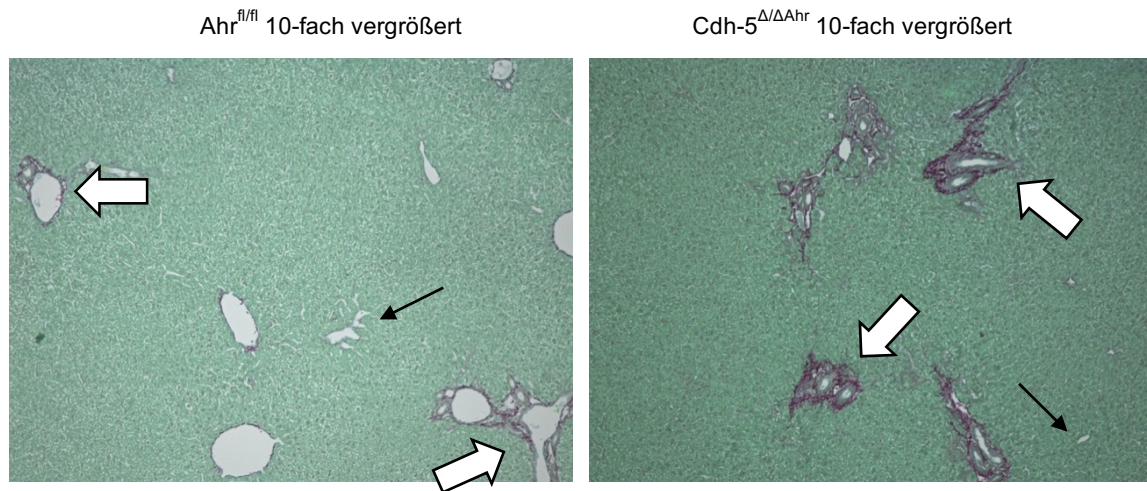


Abbildung 25: Sirius-Rot Färbung von Leberschnitten von $Ahr^{fl/fl}$ - (links) und $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Mäusen (rechts). 10-fach vergrößert. Die Gefäßwände im Bereich der Glisson-Trias (dicke, weiße Pfeile) in $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Mäusen zeigten einen deutlich höheren Kollagenanteil im Vergleich zu den Gefäßen von $Ahr^{fl/fl}$ -Mäusen. Um die Zentralvenen (schmale schwarze Pfeile) war kein Unterschied festzustellen.

Um diesen Beobachtungen weiter auf den Grund zu gehen, wurde in Immunfluoreszenzfärbungen untersucht, ob es sich um ein entzündliches Infiltrat, eine Hyperplasie der Gefäße oder eine andere Veränderung handelte. Dazu wurden zuerst die Zellkerne (DAPI, blau), das Endothel / LSECs (CD146, rot) und die Gallengänge (CK19, grün) angefärbt (Abbildung 26). Man sieht im Vergleich zwischen $Ahr^{fl/fl}$ und $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Mäusen, dass das Gefäßendothel in den $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Mäusen ein deutlich stärkeres Fluoreszenzsignal abgibt. Die Gefäßwände scheinen dicker und kräftiger zu sein.

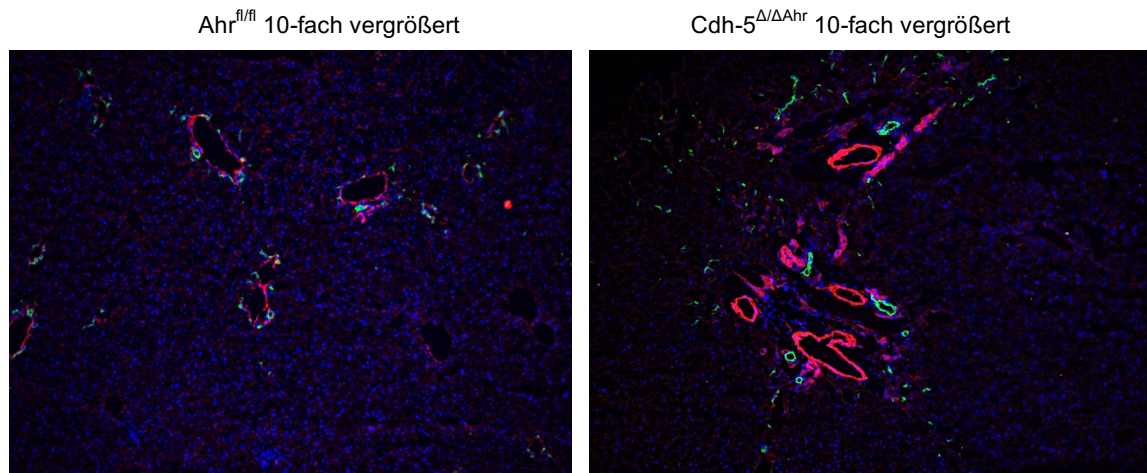


Abbildung 26: Immunfluoreszenzfärbung von LSECs / Endothel (CD146, rot), Gallengängen (CK19, grün) und Zellkernen (Dapi, blau).

10-fache Vergrößerung.

Man erkennt, dass sowohl die großen Gefäße, als auch die Gallengänge der Cdh-5^{Δ/ΔAhr}-Mäuse ein deutlich stärkeres Fluoreszenzsignal abgeben.

In einer zweiten Färbung wurde die Frage adressiert, ob es sich bei der in der HE-Färbung gesehenen Ansammlung von Zellen, um die Portalfelder um CD4⁺ T Zellen handeln könnte. Neben den Zellkernen (DAPI, blau) wurde CD4 (violett) angefärbt. Hier sieht man, dass es sich bei einem Teil der Zellen um eine Ansammlung von CD4 positiven Zellen handelt (Abbildung 27).

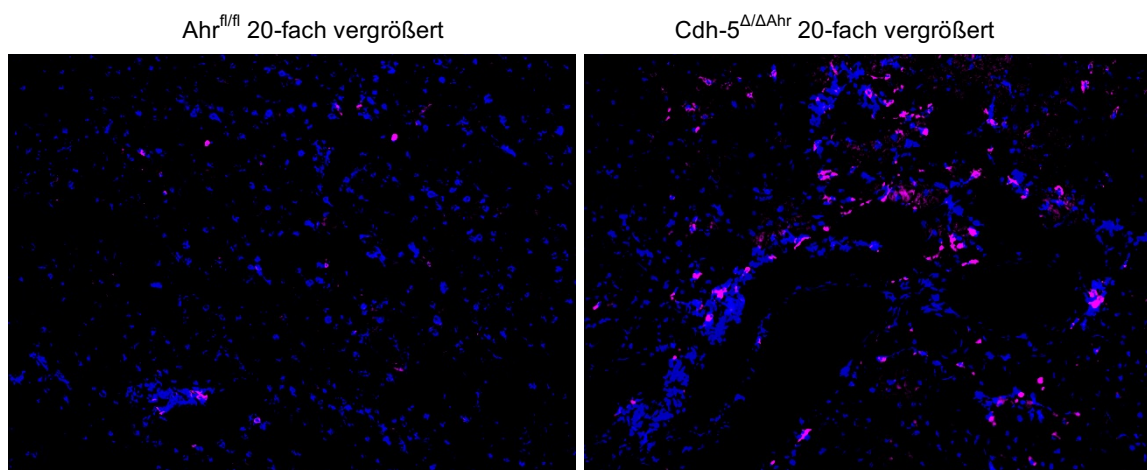


Abbildung 27: Immunfluoreszenzfärbungen von Zellkernen (DAPI, blau) und CD4⁺ Zellen (violett) in Leberschnitten von einer Ahr^{fl/fl}- sowie einer Cdh-5^{Δ/ΔAhr}-Maus.

20-fache Vergrößerung.

Auf der Suche nach einer Erklärung für die Gefäßveränderungen wurde auf RNA-Ebene nach beeinflussenden Faktoren, wie dem Vascular endothelial growth factor α (VEGF α ; Abbildung 28a) und von ihm beeinflusste NO-Synthasen (iNOS, eNOS; Abbildung 28b + c), geschaut. Die Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) synthetisieren den Botenstoff Stickstoffmonoxid (NO), der z.B. eine Vasodilatation und damit eine stärkere Durchblutung bewirkt (Förstermann et al., 1993). Während die relative Expression von VEGF α in Cdh-5 Δ/Δ Ahr-Mäusen, bezogen auf die relative Expression in Ahr $^{fl/fl}$ -Mäusen, keine signifikanten Unterschiede zeigte ($p = 0,9654$), fiel auf, dass die relative Expression der induzierbaren NOS (iNOS: 1,9-fach) signifikant ($p = 0,0085$) und die der endothelialen NOS (eNOS = 1,58-fach) zumindest tendenziell erhöht war ($p = 0,3154$).

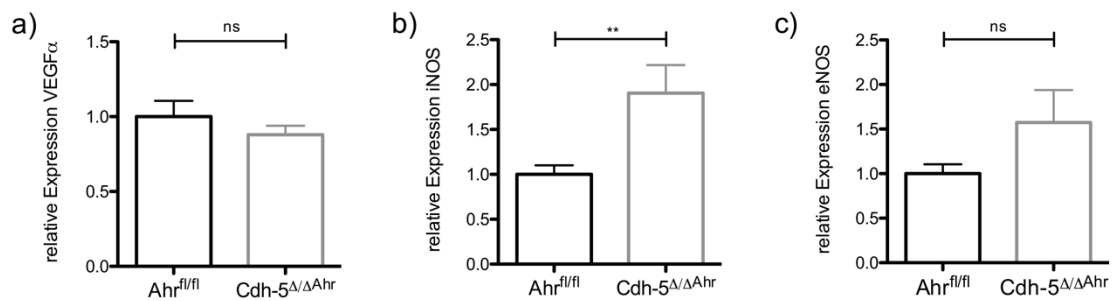


Abbildung 28: Relative Expression von VEGF α (a), iNOS (b) und eNOS (c) in Cdh-5 Δ/Δ Ahr-Mäusen bezogen auf die relative Expression in Ahr $^{fl/fl}$ -Mäusen.

Es lässt sich feststellen, dass sich die relative Expression von VEGF α (0,88) nicht signifikant unterschied ($p = 0,9654$). Die NO-Synthasen iNOS (1,9) und eNOS (1,58) hingegen zeigen eine signifikante ($p = 0,0085$) bzw. tendenziell ($p = 0,3154$) höhere Expression.

ns = nicht signifikant

Insgesamt scheint der Ahr im Endothel neben einer immunologischen Funktion auch einen Einfluss auf die Vaskularisierung innerhalb und außerhalb der Leber zu haben. Daher scheint es wahrscheinlich, dass die bereits makroskopisch sichtbaren Gefäßveränderungen (4.3.1) zumindest teilweise eine Folge der hier beschriebenen mikroskopischen Veränderungen sind. Ob es sich bei den intrahepatischen Veränderungen um eine beginnende Fibrose, eine neonatale Anomalie, eine vermehrte Gefäßproliferation mit Entzündung oder um eine Kombination der verschiedenen Einflüsse handelt, muss in Zukunft weiter untersucht werden.

Nachdem sowohl makro- als auch mikroskopische Unterschiede in den Lebern der $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Mäuse beobachtet wurden, interessierte uns, ob diese Veränderungen per se zu einem Zellularuntergang von Hepatozyten und somit zu einer Leberschädigung führen. Dazu bestimmten wir die Transaminasenkonzentrationen von acht Wochen alten Mäusen der Linie $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ und ihren Wurfgeschwistern (Abbildung 29). Es zeigte sich, dass die von uns beschriebenen Veränderungen keine Auswirkungen auf die Transaminasenkonzentration hatten.

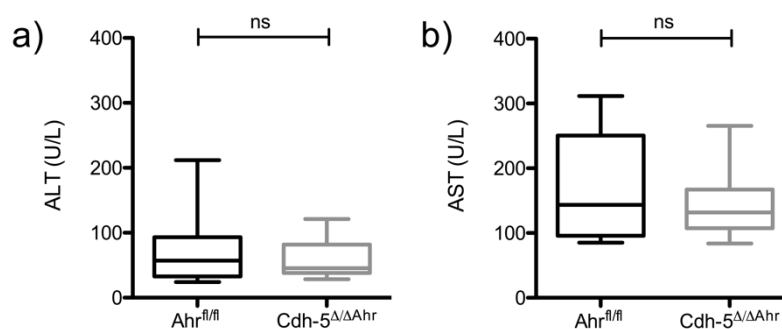


Abbildung 29: Transaminasen von 8 Wochen alten Tieren der Linie $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ und ihren Wurfgeschwistern. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Transaminasenkonzentrationen. ns = nicht signifikant

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die vaskulären Auffälligkeiten der Mäuse, in dem von uns untersuchten Alter, keine Leberschädigung auf Grund eines vermehrten Zellularuntergangs von Hepatozyten beobachtet werden konnte. Die Leberfunktion der $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Mäuse könnte jedoch trotz ausbleibendem Zellularuntergang der Hepatozyten vermindert sein. Dies sollte in Zukunft weiter untersucht werden.

5 Diskussion

5.1 Die Rolle des Ahr für die immunologische Funktion der LSECs

Der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor ist ein Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor, der in vielen verschiedenen Zellen nachgewiesen werden kann. In APCs spielt er eine wichtige immunologische Rolle z.B. in der Modulation von Zytokinantworten (Kimura et al., 2009, Simones and Shepherd, 2011, Bankoti et al., 2010b). Die Aufgaben der APCs werden in der Leber von den Leber-residenten APCs übernommen, zu denen auch die LSECs gezählt werden. Diese sind an der Immunregulation in der Leber entscheidend beteiligt (Thomson and Knolle, 2010). Unsere Hypothese war, dass der Ahr in LSECs, ähnlich wie in Makrophagen und DCs, eine wichtige immunologische Rolle spielt.

Wir konnten in dieser Arbeit bestätigen, dass der Ahr in LSECs exprimiert wird (Abbildung 4); über die Funktion des Ahr in LSECs war bisher jedoch noch nichts bekannt. Um die Bedeutung des Ahr in LSECs zu untersuchen, wurde der Rezeptor mit verschiedenen Liganden stimuliert. Gleichzeitig wurden die LSECs mit LPS aktiviert (4.1.2). In der Literatur sind für die Aktivierung des Ahr durch verschiedene Liganden bereits toleranz- sowie entzündungsfördernde Wirkungen beschrieben (Quintana et al., 2008, Zhang et al., 2010, Benson and Shepherd, 2011, Kerkvliet et al., 2009, Quintana et al., 2010, Baricza et al., 2016, Apetoh et al., 2010, Mezrich et al., 2010).

Unsere Experimente zeigten, dass eine Ahr-Aktivierung auch die Immunantwort der LSECs beeinflusst. Am Beispiel des proinflammatorischen Zytokins IL-6, welches von LSECs produziert wird (Knolle et al., 1997), konnten wir demonstrieren, dass die Aktivierung des Ahr durch die Liganden ITE und FICZ die durch LPS-Stimulation induzierte IL-6-Produktion in LSECs reduzieren konnte (Abbildung 9 - 11). Die beobachtete verminderte, proentzündliche Zytokinproduktion wies darauf hin, dass der Ahr zu einem eher tolerogenen Phänotyp in LSECs beiträgt. Dagegen zeigte sich bei der Bestimmung des antiinflammatorischen Zytokins TGF- β , dass die Ahr-Aktivierung mit den von uns verwendeten Liganden TCDD und Kynurenin keinen Einfluss auf die Produktion dieses Zytokins zu haben schien (Abbildung 5 und 7). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass diese Beobachtung auch auf die TGF- β Messung mittels ELISA zurückzuführen ist, da aktives TGF- β bereits kurz nach seiner Freisetzung an Zellmembranen bindet.

Vergleicht man nun den von uns beobachteten Einfluss des Ahr in LSECs mit seinen immunologischen Wirkungen in anderen APCs, so fällt auf, dass sowohl ähnliche als auch entgegengesetzte Wirkungen beschrieben sind. Die beiden endogenen Ahr-Liganden ITE und FICZ sorgten in unseren Experimenten stets für eine Reduktion des proinflammatorischen IL-6 und somit für eine eher tolerogene Ahr-Aktivität in LSECs (Abbildung 9 - 11).

Insbesondere ITE zeigte dabei, unabhängig von der zur Aktivierung der LSECs verwendeten LPS-Konzentrationen, konstant toleranzfördernde Effekte (Abbildung 10 und 11). Dies entsprach der beschriebenen Wirkung des Ahr-Liganden ITE in DCs, in denen ITE ebenfalls zur Induktion eines toleranzfördernden Phänotyps führte. Auch in DCs kam es unter anderem zu einer Reduktion der IL-6-Produktion nach ITE Stimulation. (Quintana et al., 2010, Yeste et al., 2012, Wei et al., 2014).

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass eine Ahr-Aktivierung mit ITE in LSECs, ähnlich wie für professionelle APCs beschrieben, einen toleranzfördernden Effekt zu haben scheint.

Im Gegensatz dazu wurde die Auswirkung einer Ahr-Aktivierung mit FICZ in APCs bisher kaum untersucht. Die Erfahrungen mit dem Liganden beziehen sich vor allem auf Studien zur T-Zell-Differenzierung, wobei insbesondere eine T_H17-fördernde Eigenschaft des FICZ beschrieben wurde (Quintana et al., 2008, Veldhoen et al., 2009). Da die Ahr-Aktivierung mit FICZ in unseren Experimenten zu einer Reduktion des proinflammatorischen IL-6 führte (Abbildung 9), scheint die Ahr-Aktivierung mit FICZ in LSECs eher toleranzfördernde Effekte zu haben.

Interessanterweise führte nicht jeder von uns getestete Ligand zu einer Ahr-Aktivierung, die einen Einfluss auf die Zytokinantwort der LSECs hatte. Neben Kynurenin (4.1.2.2) führte insbesondere das verwendete TCDD (4.1.2.1), entgegen unseren Erwartungen, zu keiner nachweisbaren Änderung in der Zytokinantwort. In der Literatur sind toleranzfördernde Effekte einer Ahr-Aktivierung mittels Kynurenin in DCs beschrieben. Diese beziehen sich jedoch auf die Induktion derIDO mit daraus resultierenden tolerogenen Effekten auf die T-Zelldifferenzierung (Mezrich et al., 2010). Daher ist es möglich, dass Kynurenin durchaus eine Ahr-Aktivierung in LSECs bewirkte, wir diese mit unserem experimentellen Setup jedoch nicht nachweisen konnten. Ähnliches gilt auch für unsere Beobachtung, dass die Ahr-Aktivierung mit TCDD zu keinerlei Veränderungen in der Zytokinantwort führte. Für die Aktivierung des Ahr mit TCDD sind vielfältige Studien veröffentlicht, die die toleranzfördernde Eigenschaft des Ahr in verschiedenen Immunzellen belegen (Quintana et al., 2008, Zhang et al., 2010, Benson and Shepherd, 2011, Kerkvliet et al., 2009, Apetoh et al., 2010).

In DCs ist der Effekt der Ahr-Aktivierung mit TCDD unter anderem vom Subtyp abhängig. So ist z.B. für ruhende DCs eine Reduktion der IL-6 und der IL-10 Antwort beschrieben (Simones and Shepherd, 2011), während in inflammatorischen DCs eine gesteigerte IL-6 und IL-10 Produktion nachgewiesen wurde (Bankoti et al., 2010b).

Unabhängig von eventuellen methodischen Ursachen (z.B. durch problematische Lösungsmittel des Liganden), die zum Ausbleiben eines Effektes des TCDD in LSECs geführt haben könnten, waren unsere Experimente nur auf die Zielmoleküle IL-6 und TGF- β ausgerichtet.

Zukünftig sollten weitere Faktoren gemessen werden, um die Bedeutung einer Ahr-Aktivierung in LSECs für deren immunologische Funktion noch besser charakterisieren zu können.

Unsere Ergebnisse erlauben den Schluss, dass der Ahr auch in LSECs eine immunologische Funktion besitzt. Jedoch sollte insbesondere in Hinblick auf die in der Literatur beschriebenen Effekte einer Ahr-Aktivierung mit TCDD, Kynurenine und FICZ auf die adaptive Immunantwort künftig auch untersucht werden, inwiefern eine Ahr-Aktivierung in LSECs auch T-Zellantworten modulieren kann. Dazu sollten z.B. Zellkulturexperimente mit LSEC/T-Zell Ko-Kulturen und Zugabe von Ahr-Liganden durchgeführt werden.

Nachdem wir untersucht hatten, welchen Einfluss eine Aktivierung des Ahr durch verschiedene Ahr-Liganden auf die immunologische Funktion der LSECs hat, wollten wir im nächsten Schritt die Konsequenz einer Ahr-Inhibition testen. Dazu aktivierten wir LSECs in vitro mit LPS und verwendeten den in der Literatur als selektiven Ahr-Inhibitor beschriebenen Liganden CH-223191 (Kim et al., 2006). Zu unserer Überraschung führte die Verwendung des Ahr-Inhibitors zu einer Reduktion der proinflammatorischen Zytokinantwort in LSECs (Abbildung 12). Dieses Ergebnis ähnelt interessanterweise den Ergebnissen, die wir bei der Aktivierung des Ahr mit ITE oder FICZ beobachten konnten (Abbildung 9 - 11). Da ITE bzw. FICZ den Ahr jedoch aktivieren und nicht hemmen, liegt der Verdacht nahe, dass CH-223191 in unseren Experimenten nicht die erwartete antagonistische Funktion hatte, sondern den Ahr in LSECs ebenfalls aktivierte. Es ist bekannt, dass durch Lichteinfluss in tryptophanhaltigen Zellkulturmedien Ahr-Liganden, wie z.B. FICZ, entstehen können (Öberg et al., 2005). Allerdings konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass CH-223191 in der Lage ist, diese Hintergrundaktivierung am Ahr zu unterbinden (Veldhoen et al., 2009, Ilchmann et al., 2012). Daher kann eine Aktivierung des Ahr über im Medium entstandene Ahr-Agonisten, trotz der Verwendung eines tryptophanreichen Mediums, mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Interessanterweise sank die von uns gemessene IL-6 Konzentration im Zellkulturüberstand mit steigender InhibitorKonzentration (Abbildung 12). Diese Beobachtung spricht zusätzlich für ein aktivierendes, agonistisches Verhalten des CH-223191 am Ahr.

Da auch bei anderen Liganden ein konzentrationsabhängiger Wechsel zwischen agonistischem und antagonistischem Verhalten beobachtet werden konnte (Zhang et al., 2003), vermuten wir, dass CH-223191, in den von uns verwendeten Konzentrationen, am Ahr als Agonist gewirkt haben könnte.

Um unsere Vermutung eines konzentrationsabhängigen Verhaltens zu überprüfen, sollten die LSEC-Stimulations-Experimente mit verschiedenen CH-223191 Konzentrationen wiederholt werden, die sowohl über als auch unter den bisher getesteten Konzentrationen liegen. Eine mögliche Aktivierung ließe sich unter anderem mit Ahr-aktivierungsabhängigen Molekülen, wie z.B. Cyp1A1, überprüfen (Quintana and Sherr, 2013). Damit die immunologische Relevanz einer fehlenden Ahr-Wirkung in LSECs zuverlässig untersucht werden kann, könnte alternativ der mittlerweile neu entdeckte, spezifische Ahr-Antagonist GNF-351 verwendet werden (Smith et al., 2011).

Neben der Verwendung des chemischen Ahr-Inhibitors wurden auch Ahr-defiziente LSECs der Mauslinie $Cdh-5^{\Delta\Delta Ahr}$ für unsere in vitro Studien verwendet. Tiere dieser konditionalen Knock-out Mauslinie exprimieren von Geburt an keinen funktionstüchtigen Ahr in ihren Endothelzellen. Wie bereits oben beschrieben wurden auch diese LSECs mit LPS stimuliert. Als Read-out diente erneut das proinflammatorische Zytokin IL-6 (4.1.3). In unseren Experimenten zeigte sich, dass LPS-aktivierte, Ahr-defiziente LSECs eine signifikant stärkere proinflammatorische Immunantwort generieren (Abbildung 13). Damit gleichen unsere Ergebnisse denen von Kimura et al., die für Makrophagen ebenfalls eine verstärkte proinflammatorische Zytokinantwort nach LPS-Stimulation nachweisen konnten (Kimura et al., 2009). In DCs hingegen sorgt das Fehlen des Ahr nicht für eine Verstärkung der proinflammatorischen Zytokinantwort, sondern führt zu einer Reduktion von antiinflammatorischen Zytokinen (Nguyen et al., 2010).

Insgesamt scheint das Fehlen des Ahr in APCs so zu einem eher entzündungsfördernden Phänotyp zu führen. In LSECs führte ein fehlender Ahr zu einer gesteigerten Produktion von IL-6 in Antwort auf LPS. Ähnlich wie bei den Stimulationsversuchen mit den aktivierenden Ahr-Liganden, sollten auch bei Ahr-Inhibitionsversuchen und bei Stimulation Ahr-defizienter LSECs in Zukunft neben IL-6 weitere immunologisch relevante Zielmoleküle untersucht werden, um valide Aussagen über die Bedeutung des Ahr für die Immunfunktion von LSECs treffen zu können. So sollten unter anderem auch antiinflammatorische Zytokine wie TGF- β bestimmt werden oder Chemokine wie CXCL9 (Shetty et al., 2018), die von aktivierten LSECs produziert werden können.

Zusammenfassend zeigen unsere *in vitro* Experimente, dass der Ahr die immunologischen Funktionen von LSECs reguliert. Da eine Aktivierung des Ahr eher toleranzfördernde Effekte aufweist und sein Fehlen zu einer gesteigerten proinflammatorischen Zytokinantwort führte, scheint der Ahr in LSECs, ähnlich wie in Makrophagen, die immunologische Reaktion in Richtung Toleranz zu modulieren.

Die toleranzfördernde Funktion des Ahr in LSECs wurde von uns nun weiterführend *in vivo* untersucht.

5.2 Bedeutung des Ahr für die Etablierung von LPS-Toleranz *in vivo*

Vor kurzem konnte nachgewiesen werden, dass der Ahr *in vivo* an der Etablierung von Toleranz gegenüber LPS beteiligt ist (Bessede et al., 2014). In der Leber sind LSECs an der LPS-Toleranz beteiligt und in LPS-toleranten LSECs spielt unter anderem eine reduzierte IL-6 Produktion eine entscheidende Rolle (Uhrig et al., 2005). Da wir in unseren Experimenten zeigen konnten, dass insbesondere die Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-6 in LSECs vom Ahr beeinflusst wird (vgl. *in vitro* Experimente), war unsere Hypothese, dass der Ahr in der Etablierung der LPS-Toleranz von LSECs auch *in vivo* eine Rolle spielt. Um diese Hypothese zu untersuchen injizierten wir sowohl den Mäusen mit spezifischer Ahr-Defizienz in Endothelzellen ($Cdh-5^{\Delta/\Delta} Ahr$ -Mäuse) als auch deren Wurfgeschwistern LPS (4.2).

Diese LPS-Behandlung führte zu einer signifikant gesteigerten IL-6 Antwort im Serum der Tiere mit Ahr-defizienten LSECs (Abbildung 15). Damit ähneln die *in vivo* Ergebnisse denen unserer Zellkulturversuche. Auch hier war die IL-6 Produktion in LSECs ohne Ahr nach LPS-Stimulation deutlich gesteigert (Abbildung 13). Interessanterweise stimmen unsere Befunde in $Cdh-5^{\Delta/\Delta} Ahr$ -Mäusen mit den Ergebnissen von Bessede et al. überein. Hier führte die LPS-Behandlung kompletter $Ahr^{-/-}$ -Mäuse ebenfalls zu einer signifikant erhöhten IL-6-Konzentration im Serum (Bessede et al., 2014). Dies unterstreicht die Bedeutung der Endothelzellen für die Ahr-abhängige LPS-Toleranz. Da die Ahr-Defizienz in den von uns verwendeten $Cdh-5^{\Delta/\Delta} Ahr$ -Mäusen jedoch alle Endothelzellen betrifft, und nicht auf LSECs beschränkt ist, könnte es auch sein, dass neben den LSECs auch andere Endothelzellen zur Ahr-abhängigen LPS-Toleranz beitragen. Allerdings konnten wir zeigen, dass passend zu unserer Vermutung, auch die IL-6 Expression im Lebergewebe LPS-stimulierter $Cdh-5^{\Delta/\Delta} Ahr$ -Mäuse signifikant erhöht war (Abbildung 16). Zusammen mit den an isolierten LSECs *in vitro* erhobenen Daten (s.o.) ist davon auszugehen, dass die LSECs einen erheblichen Anteil zur Ahr-abhängigen LPS-Toleranz *in vivo* beitragen.

Somit scheint der Ahr in LSECs eine relevante Rolle in der Etablierung und Aufrechterhaltung von LPS-Toleranz zu spielen. Um der Problematik des Ahr-Knockout des gesamten Endothels in Zukunft entgegenzuwirken, sollte in zukünftigen Versuchen ein für LSECs noch spezifischerer Promotor für die Expression der Cre-Rekombinase verwendet werden.

Es ist auch denkbar, dass der Ahr nicht nur die Expression von IL-6 in LSECs moduliert, sondern auch die Expression von anderen immunologisch relevanten Molekülen, wie z.B. die Expression von MHCII oder kostimulatorischen oder koinhibitorischen Molekülen die für die Interaktion mit T-Zellen relevant sind. Für DCs ist beschrieben, dass die Aktivierung des Ahr die Expression von MHC II, CD86, CD80 und CD11c moduliert (Bankoti et al., 2010b, Vogel et al., 2008, Simones and Shepherd, 2011, Bankoti et al., 2010a) und die Differenzierung und Aktivierung von T-Zellen durch DCs beeinflusst (Mezrich et al., 2010, Nguyen et al., 2010, Quintana et al., 2010).

Um zu untersuchen, ob der Ahr in der Expression dieser Oberflächenmarker eine Rolle spielt, wurden die nichtparenchymatösen Leberzellen der mit LPS-behandelten Tiere mittels Durchflusszytometrie analysiert. Hier zeigte sich, dass das Fehlen des Ahr in LSECs keinerlei Auswirkungen auf die Anzahl der LSECs (CD146) und der DCs (CD11c) in den Lebern hatte (Abbildung 17 a + b). Interessanterweise konnten wir jedoch eine CD11c / CD146 doppelt positive Zellpopulation identifizieren, die bei $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Mäusen signifikant erhöht war (Abbildung 17 c). In der Literatur ist für LSECs die Expression von CD11c in vitro beschrieben. Da LPS-Stimulation die CD11c-Expression vollständig zu unterdrücken scheint, wird angenommen, dass die physiologische LPS-Konzentration in vivo ursächlich für das Fehlen von CD11c auf der LSEC-Oberfläche in vivo sein könnte (Knolle et al., 1999c). Die hier von uns beschriebene CD146 / CD11c doppelt positive Zellpopulation ist so möglicherweise die Folge einer ausbleibenden CD11c-Reduktion durch einen fehlenden Ahr. Die genauen Eigenschaften dieser Zellpopulation, insbesondere in Hinblick auf ihre APC Funktion sollten in Zukunft weiter untersucht werden.

In DCs hat der Ahr auch Einfluss auf die Expression von MHC II und CD86 (Bankoti et al., 2010b). LSECs sind in der Lage diese Oberflächenmoleküle zu exprimieren und hierüber mit T-Zellen zu interagieren (Lohse et al., 1996, Carambia et al., 2013, Carambia et al., 2014, Knolle et al., 1999b, Wohlleber and Knolle, 2016). Unsere Hypothese war, dass der Ahr auch in LSECs an der Expressionsregulation dieser Oberflächenmoleküle beteiligt ist. Tatsächlich konnten wir feststellen, dass sowohl MHC II als auch CD86 in LSECs der $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Mäuse hochreguliert waren (Abbildung 18 a + b).

Interessanterweise ist für LPS, neben dem oben genannten Einfluss auf die CD11c-Expression, in LSECs auch eine herabregulierende Wirkung auf MHC II, CD80 und CD86 beschrieben. In *vivo* könnte dieser Mechanismus an der Etablierung der Immuntoleranz im Lebersinusoid beteiligt sein (Knolle et al., 1999a). Ursächlich für die ausgebliebene LPS-induzierte Reduktion von MHC II und CD86 in den $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ LSECs scheint hier das Fehlen des Ahr zu sein.

Zusammenfassend zeigen unsere Experimente, dass der Ahr auch in LSECs an der Expressionsregulation von kostimulatorischen oder koinhibitorischen Molekülen beteiligt ist. Somit könnte der Ahr einen entscheidenden Einfluss auf LSEC-induzierte T-Zell-Antworten haben. Ob und wie der Ahr auch an anderen APC-Funktionen von LSECs beteiligt ist, muss in Zukunft weiter untersucht werden. Denkbar sind unter anderem Ko-Kultur Experimente mit LSECs und T-Zellen und Ahr-Aktivierung bzw. -Inhibition, um die Rolle des Ahr bei LSEC-induzierten T-Zellantworten zu untersuchen.

Während das Fehlen des Ahrs in LSECs sowohl die Zytokinantwort als auch die Expression immunologisch relevanter Oberflächenmoleküle beeinflusste, schien der durch LPS-Gabe entstandene Leberschaden nicht beeinflusst zu werden (Abbildung 14). Verglichen mit den Transaminasenkonzentrationen von unbehandelten Tieren zeigte sich zwar insgesamt eine Erhöhung der Werte in LPS-behandelten Tieren, diese war jedoch interessanterweise unabhängig von der Ahr-Expression in Endothelzellen. Aufgrund der offensichtlichen Unterschiede zwischen den Phänotypen der beiden Mauslinien vermuteten wir auch einen unterschiedlich ausgeprägten Leberschaden. Dies könnte auch zeitpunktabhängig sein, sodass weitere Untersuchungen zu anderen Zeitpunkten nach LPS-Gabe notwendig sind, um dies abschließend zu klären.

Der Phänotyp der $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Mäuse wurde von uns anschließend ausführlicher charakterisiert.

5.3 Phänotypische Merkmale von Mäusen der Linie Cdh-5^{Δ/ΔAhr}

Der Ahr erfüllt sowohl in der Embryonalentwicklung, als auch in adulten Lebewesen, wichtige physiologische Funktionen (Nguyen and Bradfield, 2008, Quintana and Sherr, 2013). Diverse Studien mit Ahr-KO Mäusen belegen, dass das Fehlen des Ahr im Organismus zu verschiedenen phänotypischen Veränderungen führt (Fernandez-Salguero et al., 1997, Fernandez-Salguero et al., 1995, Schmidt et al., 1996). Auch wir konnten für die von uns verwendete Mauslinie Cdh-5^{Δ/ΔAhr} einen bestimmten Phänotyp charakterisieren. Besonders auffällig waren Veränderungen an den Gefäßen der Cdh-5^{Δ/ΔAhr}-Mäuse. Bereits makroskopisch konnte ein signifikant erhöhter Durchmesser der Portalvene (PV) (Abbildung 19 + 20) sowie deutlich erweiterte Mesenterialgefäße (Abbildung 21) der Cdh-5^{Δ/ΔAhr}-Mäuse festgestellt werden. Des Weiteren fiel auch eine Vergrößerung der Milz in den Cdh-5^{Δ/ΔAhr}-Mäusen auf (Abbildung 22). Ähnliche Beobachtungen, insbesondere eine Vergrößerung der V. portae bzw. eine Splenomegalie, konnten bereits in mehreren Studien mit Ahr-KO-Mäusen gemacht werden (Fernandez-Salguero et al., 1997, Schmidt et al., 1996, Harstad et al., 2006).

Als Ursache für die Erweiterung der Gefäße wird in der Literatur sowohl eine intrahepatische Abflussbehinderung als auch eine ausbleibende Vasokonstriktion diskutiert (Lahvis et al., 2005, Harstad et al., 2006). Daraus könnte, durch einen Rückstau des Blutes, eine Splenomegalie resultieren (Schmidt et al., 1996). Die Kombination aus Vasodilatation, Splenomegalie und beobachtetem Aszites erinnert dabei stark an die Folgen einer portalen Hypertonie (Fernandez-Salguero et al., 1997).

Neben der ausbleibenden Vasokonstriktion von großen Lebergefäßen finden sich in der Literatur auch Berichte über eine unreife bzw. neonatale Gefäßsituation in Mäusen denen der Ahr vollständig fehlt. Dazu zählen unter anderem eine neonatale Architektur der Sinusoide und ein persistierender Ductus venosus (DV) (Lahvis et al., 2000). Ursächlich für die vaskulären Veränderungen scheint dabei insbesondere das Fehlen des Ahr in Endothelzellen zu sein (Walisser et al., 2005).

Da auch in den von uns verwendeten Mäusen der Ahr in Endothelzellen fehlt, könnte es sein, dass auch die hier verwendeten Cdh-5^{Δ/ΔAhr}-Mäuse einen eher neonatalen bzw. unreifen Gefäßstatus besitzen. Ein Hinweis darauf könnten von uns gemachte Beobachtungen während der LSEC-Isolation aus Ahr-defizienten Tieren sein. Im Vergleich zur Zellisolation aus Wildtyp- und Wurfgeschwistern war die Zellausbeute in Cdh-5^{Δ/ΔAhr}-Mäusen pro Leber deutlich reduziert. Ursächlich dafür schien unter anderem eine insuffiziente Leberperfusion zu sein (vgl. 4.1.3).

Als mögliche Erklärung käme hier neben einer gestörten Mikroarchitektur, ähnlich wie bei Walisser et al., ein offener Ductus venosus infrage, durch den der Großteil der Kollagenaselösung, unter Umgehung der Lebersinusoide, direkt in den Körperkreislauf gelangt.

Was mit Sicherheit gesagt werden kann, ist, dass die $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Mäuse auch intrahepatische Gefäßveränderungen aufweisen. Mittels MRT konnten wir Unterschiede in den intrahepatischen Gefäßbäumen sichtbar machen (Abbildung 23). Zusätzlich fielen mikroskopisch Gefäßveränderungen im Bereich der Glisson-Trias auf (Abbildung 24 + 25). Hier zeigte sich, neben einer vermehrten Kollagenablagerung, auch eine deutlich erhöhte Zelldichte. Diese Beobachtungen ähneln damit dem Phänotyp, der für Ahr-KO-Mäusen beschrieben wurde. In der Literatur finden sich für Ahr-KO Mäuse Berichte über eine unterschiedlich stark ausgeprägte Fibrose der Portalregion, eine Gefäßproliferation vor allem kleiner Gefäße sowie eine periportale Hyperzellularität (Fernandez-Salguero et al., 1995, Fernandez-Salguero et al., 1997, Schmidt et al., 1996). Die von uns beobachtete vermehrte Kollagenablagerung und Hyperzellularität um die Gefäße könnten als beginnende Fibrose angesehen werden. Bei den Zellansammlungen im Bereich der Portalfelder handelte es sich teilweise um Ansammlungen von CD4 positiven Zellen (Abbildung 27), die Teil eines milden entzündlichen Infiltrats sein könnten.

Zusätzlich konnten wir in Immunfluoreszenzfärbungen der betroffenen Lebern eine Verdickung des Endothels von Gefäßen nachweisen (Abbildung 26). Eine vermehrte Gefäßneubildung konnten wir hingegen nicht feststellen. Dagegen spricht zusätzlich, dass einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren der Angiogenese, der Vascular Epithelial Growth Factor (VEGF) (Ylä-Herttuala et al., 2007), im untersuchten Lebergewebe nicht vermehrt exprimiert wurde (Abbildung 28 a).

Im Gegensatz dazu zeigten die Stickstoffmonoxid-Synthasen eNOS und iNOS eine gesteigerte Expression (Abbildung 28 b + c), deren Ursache aktuell noch ungeklärt ist. Lavis et al. beschreibt bei seinen Ahr-KO Mäusen eine verringerte Leberdurchblutung, die am ehesten in einer veränderten Gefäßmorphologie begründet ist. Denkbar wäre, dass die gesteigerte Expression von eNOS und iNOS eine Reaktion auf die zu geringe Durchblutung des Lebergewebes darstellt, da die Stickstoffmonoxid-Synthasen den Botenstoff NO synthetisieren, der Vasodilatation und damit eine stärkere Durchblutung vermittelt (Förstermann et al., 1993).

Eine gesteigerte intrahepatische NO-Synthese wäre insbesondere vor dem Hintergrund einer möglichen portalen Hypertension (PHT) interessant. Zwar ist durch die Stickstoffmonoxid-Synthasen erzeugtes NO die wichtigste Substanz, die die beobachtete massive systemische arterielle Vasodilatation in der Zirrhose-bedingten portalen Hypertension vermittelt, intrahepatisch kommt es bei Zirrhose jedoch normalerweise zu einer Reduktion der NO-Synthasen (Iwakiri, 2007). Damit spräche diese Beobachtung gegen eine zirrhotische Genese der möglichen PHT.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich ein Fehlen des Ahr in Endothelzellen phänotypisch in Veränderungen ausdrückt, die an die Folgen eines erhöhten Pfortaderdruckes erinnern. Neben den, auch bei unseren Tieren, beobachteten Veränderungen wie Splenomegalie und Aszites gelten auch Ösophagusvarizen und eine portale hypertensive Gastropathie als Folge einer portalen Hypertension. Daher sollte in weiteren Versuchen auch nach diesen Veränderungen Ausschau gehalten werden.

Ätiologisch lassen sich bei einer portalen Hypertension prä-, intra- und posthepatische Ursachen unterscheiden. Mit Abstand am häufigsten ist dabei in der westlichen Welt ein sekundärer sinusoidaler portaler Hypertonus aufgrund einer Zirrhose (Bloom et al., 2015). Interessanterweise zeigen die von uns verwendeten $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ - Mäuse zwar Veränderungen, die auf einen erhöhten portalvenösen Druck hindeuten, mikroskopisch findet sich jedoch kein Anhalt für eine Zirrhose.

Dieses Bild, einer portalen Hypertension ohne Zirrhose, findet man unter anderem auch in der sogenannten „Ideopathic non-cirrhotic portal hypertension“ (INCPH), einer seltenen Erkrankung, die mit subtilen histologischen Veränderungen einhergeht (Schouten et al., 2015, Guido et al., 2019). Eine dieser subtilen, jedoch charakteristischen histologischen Veränderungen ist eine Fibrose im Bereich des Portaltraktes. Guido et al. beschrieben unter dem Begriff der Portalvenen-Stenose eine inkomplette bis komplette Stenose eines Portalvenenastes mit Verdickung der Gefäßwand. Auffällig ist zusätzlich die erhöhte Zellkerndichte in diesem Bereich (Guido et al., 2019). Damit ähneln sie interessanterweise den von uns beschriebenen histologischen Veränderungen (vgl. Abbildung 24). In Zukunft sollte weiter geklärt werden, ob es sich bei den von uns beschriebenen intrahepatischen Veränderungen um eine beginnende Fibrose, eine vermehrte Gefäßproliferation mit Entzündung oder um eine Kombination daraus handelt. Da die $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ - Mäuse zusätzlich keinen massiven Leberschaden im Sinne erhöhter Transaminasen (Abbildung 29) entwickeln und auch bei der INCPH im Großteil der Fälle eine normale Leberfunktion beobachtet werden kann, eignen sich die $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ - Mäuse eventuell als ein Maus-Modell, um Pathomechanismen dieser Erkrankung zu untersuchen.

5.4 Ausblick

5.4.1 Die Rolle des Ahr für die immunologische Funktion der LSECs

In unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass der Ahr in LSECs eine wichtige immunologische Rolle zu haben scheint. Durch die Aktivierung des Ahr konnten wir dies am Beispiel für das proinflammatorische Zytokin IL-6 nachweisen. Da unser Read-out jedoch bisher nur die beiden Zytokine IL-6 und TGF- β einschließt, ist für die Zukunft geplant, weitere immunologisch relevante Zytokine und Chemokine zu untersuchen. So wäre zum Beispiel die Bestimmung von CXCL9, CXCL10 und CXCL12 in Hinblick auf die Interaktion bzw. Rekrutierung von T-Zellen interessant (Shetty et al., 2018, DeLeve and Maretti-Mira, 2017). Bei dem von uns gemessenen TGF- β ist zu überlegen, ob es sinnvoll sein könnte, die Messmethode zu variieren. Da aktives TGF- β bereits kurz nach seiner Freisetzung an Zellmembranen bindet, war es eventuell in unserer Messmethode nicht mehr nachweisbar. Denkbar wäre, die Expression des Zytokins auf RNA-Ebene zu messen oder aber das Ankerprotein GARP auf der Zelloberfläche nachzuweisen (Carambia et al., 2014).

Außerdem sollte die Ahr-Aktivierung mit TCDD weiter untersucht werden. Denkbar ist hier z.B. die Verwendung eines anderen Lösungsmittels wie z.B. DMSO, um eventuelle methodische Probleme durch das verwendete Toluol zu identifizieren, oder aber die Testung weiterer TCDD-Konzentrationen.

Neben der Produktion von Zytokinen nach Ahr-Aktivierung ist es auch interessant, wie sich die Aktivierung durch die unterschiedlichen Liganden auf andere immunologische Funktionen der LSECs auswirkt. Denkbar ist hier unter anderem eine Charakterisierung der LSECs nach Ahr-Aktivierung, z.B. in Hinblick auf die Expression von Oberflächenmolekülen, die der T-Zell-Stimulation dienen. Dazu können unter anderem die Durchflusszytometrie oder auch molekularbiologische Methoden zum Einsatz kommen.

Um die Auswirkungen eines aktivierten Ahrs in LSECs auf die LSEC/T-Zell Interaktion zu untersuchen, sind Zellkulturexperimente mit LSEC/T-Zell Ko-Kulturen unter Zugabe von Ahr-Liganden geplant. Außerdem wäre es interessant, zu untersuchen, ob vergleichbare Beobachtungen auch bei einer LSEC-Stimulation mit anderen TLR Liganden gemacht werden können.

In Hinblick auf unsere Versuche mit dem Ahr-Inhibitor CH-223191 ist geplant, die Versuchsreihe um verschiedene weitere, höhere und niedrigere Inhibitor-Konzentrationen zu erweitern. Unsere Beobachtungen weisen darauf hin, dass der Inhibitor in der Lage zu sein scheint, den Ahr zu aktivieren. Um das zu überprüfen, sollen weitere downstream Moleküle des aktivierten Ahr, wie z.B. CYP1A1 gemessen werden (Quintana and Sherr, 2013).

Alternativ steht mittlerweile mit GNF-351 ein neuer, laut Literatur spezifischerer, Ahr-Antagonist, für die hier genannten Fragestellungen, zur Verfügung (Smith et al., 2011). Bei weiteren Versuchen mit einem Ahr-Inhibitor oder mit Zellen der $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ Mäuse sollte der experimentelle Read-out erweitert werden und eine Charakterisierung von LSECs auch in Hinblick auf die Expression von Oberflächenmolekülen erfolgen.

5.4.2 Bedeutung des Ahr für die Etablierung von LPS-Toleranz *in vivo*

Neben unseren Beobachtungen in der Zellkultur konnten wir auch *in vivo* eine wichtige Rolle des Ahr für die hepatische Toleranz nachweisen. Am Beispiel der LPS-Toleranz konnten wir zeigen, dass der Ahr an der Aufrechterhaltung dieser Toleranz in LSECs beteiligt ist. In Zukunft sollte diese Rolle des Ahr, durch die Verwendung eines für LSECs spezifischeren Promoters, validiert werden. Zusätzlich sollten, ähnlich wie bei den *in vitro* Experimenten, verschiedene weitere Zytokine und Chemokine bestimmt werden. Dazu wäre es auch interessant, die injizierte LPS-Dosis zu variieren und andere Zeitpunkte zu untersuchen, um die Dynamik der Zytokinproduktion zu erfassen.

Wir können aktuell nicht ausschließen, dass der mauseigene Phänotyp der $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ Mäuse einen relevanten Einfluss auf die LPS-Toleranz oder andere Toleranzmechanismen hat. Dazu wäre in Zukunft eine induzierbare Ahr-Defizienz in LSECs von Nöten.

Da neben den LSECs auch KCs an der LPS-Toleranz in der Leber beteiligt sind, sollte in Zukunft auch die Auswirkung einer Ahr-Defizienz in KCs in Hinblick auf deren immunologische Funktionen weiter untersucht werden (Knolle et al., 1997).

Die von uns entdeckte CD146 / CD11c doppelt positive Zellpopulation in Kombination mit den Expressionsveränderungen der Oberflächenmoleküle MHC II und CD80/86 spricht für einen Einfluss des Ahr auf die LSEC / T-Zell Interaktion. Diese sollte in Zellkultur-experimenten mit Ko-Kulturen aus z.B. LSECs und T-Zellen oder LSECs, DCs und T-Zellen weiter adressiert werden. Des Weiteren ist geplant, die von CD146 / CD11c doppelt positive Zellpopulation weitergehend zu charakterisieren. Auch hier sind durchflusszytometrische oder molekularbiologische Untersuchungen denkbar.

5.4.3 Phänotypische Merkmale von Mäusen der Linie Cdh-5^{Δ/ΔAhr}

Während unserer immunologischen Untersuchungen haben wir auch den Phänotyp der Cdh-5^{Δ/ΔAhr} Mäuse genauer untersucht. Die Tiere zeigten Veränderungen, die stark an die Folgen einer portalen Hypertension erinnern. Bisher konnten wir allerdings nicht klären, ob bei den Tieren ein portaler Hypertonus vorliegt. Hier soll in Zukunft weiter untersucht werden, ob ein erhöhter Pfortaderdruck herrscht und ob die beobachteten Veränderungen auf einen solchen zurückzuführen sind oder aber druckunabhängig entstehen. Sollte sich ein erhöhter Pfortaderdruck bestätigen, wären die Tiere gegebenenfalls ein interessantes Modell zur weiteren Erforschung der ideopathischen, nicht-zirrhatischen portalen Hypertension, da die Tiere in unserer Beobachtungszeit, wenn überhaupt, nur eine leichte Fibrose entwickelten und anscheinend keinen größeren Leberschaden davontrugen.

Nichtsdestotrotz sollten auch die intrahepatischen Veränderungen weiter untersucht werden. Ziel ist es, die von uns beobachteten Veränderungen einer Ursache zuzuordnen. Da die endothelspezifische Ahr-Defizienz eindeutig mit Veränderungen an den Gefäßen einhergeht, könnte zusätzlich auch interessant sein, in welchen anderen Organen Gefäßveränderungen auftreten und welchen Einfluss sie auf die jeweilige Organfunktion haben.

6 Zusammenfassung

Hintergrund: In der Leber herrscht unter physiologischen Bedingungen ein tolerogenes Milieu, das eine überschießende Immunantwort gegenüber harmlosen Antigenen verhindert. Diese Immuntoleranz wird vor allem von Leber-residenten APCs, wie den LSECs, etabliert. So sind LSECs an der Produktion und Sekretion antientzündlicher Mediatoren und der tolerogene Stimulation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie an der Toleranz gegenüber LPS beteiligt (Thomson and Knolle, 2010, Uhrig et al., 2005). Der Ahr ist unter anderem für seine immunmodulierende Funktion bekannt (Quintana and Sherr, 2013). Studien zeigen, dass er eine wichtige Rolle in der Zytokinantwort von APCs wie Makrophagen und DCs spielt (Kimura et al., 2009, Bankoti et al., 2010b). In der Leber scheint der Ahr ebenfalls immunologisch relevante Funktionen zu haben. So konnte gezeigt werden, dass er eine wichtige Rolle in der LPS-Toleranz spielt (Bessede et al., 2014). Des Weiteren äußert sich ein Fehlen des Ahr in generellen Immundefekten und Veränderungen des Leberphänotyps (Fernandez-Salguero et al., 1995). Da über die Funktion des Ahr in LSECs bisher nichts bekannt war, sollte in dieser Arbeit eine mögliche immunmodulatorische Rolle des Ahr in LSECs untersucht werden.

Ergebnisse: Wir konnten zeigen, dass LSECs den Ahr exprimieren und, dass pro-entzündliche Zytokinantworten nach LPS-Stimulation durch den Ahr reguliert werden. An isolierten LSECs konnten wir demonstrieren, dass die Aktivierung des Ahr durch endogene Liganden *in vitro* die Produktion des proentzündlichen Zytokins IL-6 nach LPS-Stimulation reduzierte. Wurden hingegen LSECs aus Mäusen mit Endothel-spezifischer Ahr-Defizienz (Cdh-5^{Δ/ΔAhr}) verwendet, so zeigte sich die IL-6 Produktion nach LPS-Stimulation signifikant gesteigert. Neben dieser Rolle bei der Aufrechterhaltung von hepatischer LPS-Toleranz konnten wir *in vivo* auch zeigen, dass der Ahr in LSECs an der Expressionsregulation von kostimulatorischen Molekülen beteiligt zu sein scheint und somit möglicherweise die Induktion einer T-Zellantwort durch LSECs moduliert. Im Laufe unserer Studie fielen uns typische Veränderungen in Mäusen der Linie Cdh-5^{Δ/ΔAhr} auf. Neben intra- und extrahepatischen Gefäßveränderungen konnten wir sowohl Aszites, als auch eine Splenomegalie beobachten. Diese Veränderungen erinnern an die Folgen einer portalen Hypertonie, z.B. als Folge einer Leberzirrhose. In unseren Tieren war jedoch maximal eine gering ausgeprägte Fibrose zu beobachten.

Schlussfolgerung: Der Ahr hat in LSECs eine wichtige immunologische Funktion, insbesondere hinsichtlich der LPS-Toleranz. Zusätzlich könnte er auch an der Induktion von T-Zell-Toleranz durch LSECs beteiligt sein. Dies muss jedoch in Zukunft weiter untersucht werden. Des Weiteren muss geklärt werden, inwiefern der gefundene Phänotyp der Cdh-5^{Δ/ΔAhr} Mauslinie erlaubt, diese Tiere als experimentelles Modell zur Untersuchung einer nicht-zirrhatischen portalen Hypertension zu verwenden.

7 Summary

Background and Aim: Under physiological conditions, the liver maintains a tolerogenic environment, which prevents harmful immune responses against innocuous antigens (e.g. nutrients, bacterial antigens) reaching the liver via the portal blood stream. Liver-resident antigen-presenting cells (APCs), such as LSECs, are the key mediators of hepatic tolerance. LSECs participate in the production and secretion of anti-inflammatory cytokines and the tolerogenic stimulation of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells and LSECs are important for LPS-tolerance (Thomson and Knolle, 2010, Uhrig et al., 2005). The arylhydrocarbon receptor (Ahr) is especially known for its immunomodulatory function (Quintana and Sherr, 2013). In APCs, Ahr is essential for modulating the cytokine response (Kimura et al., 2009, Bankoti et al., 2010b). In the liver, Ahr seems to have important immunological functions as well. It was shown that Ahr plays an important role in hepatic LPS-tolerance (Bessede et al., 2014). Furthermore, Ahr-KO mice exhibit general immunodeficiency and changes in liver phenotype (Fernandez-Salguero et al., 1995). The exact function of Ahr in LSECs is currently still unknown. The aim of this study was to examine the immunomodulatory role of Ahr in LSECs.

Results: We could show that LSECs express Ahr and that the proinflammatory response of LSECs to LPS-stimulation is regulated by Ahr. In cultured, primary LSECs, we were able to demonstrate that Ahr-activation with endogenous Ahr ligands reduced the production of the proinflammatory cytokine IL-6 in response to stimulation with LPS. Conversely, LSECs from mice lacking Ahr in endothelial cells (*Cdh-5^{Δ/ΔAhr}*) showed an increased IL-6 production following LPS-stimulation.

In vivo we could confirm that Ahr in LSECs is important for maintenance of hepatic LPS tolerance. Moreover Ahr regulated the expression of co-stimulatory molecules in LSECs. Thus, it is possible that Ahr might modulate LSEC-induced T-Cell responses.

Cdh-5^{Δ/ΔAhr} mice manifested a distinctive phenotype, characterized by the alteration of intra- and extrahepatic vessels, ascites and splenomegaly, which were reminiscent of the typical changes seen in portal hypertension. This phenotype seemed to be idiopathic, as it was not associated with cirrhosis, which is the most common cause of portal hypertension.

Conclusion: Ahr in LSECs has an important immunological function, especially in LPS tolerance. Moreover, Ahr seemed to modulate the expression of costimulatory molecules by LSECs, suggesting that it might regulate LSEC-induced T-cell-responses, which should be further investigated. Furthermore, *Cdh-5^{Δ/ΔAhr}* mice might serve as an experimental model for idiopathic non-cirrhotic portal hypertension.

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Ahr	Aryl Hydrocarbon Rezeptor
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP-1	Activator Protein-1
APC	Antigen-präsentierende Zelle
Ara9	Ahr-assoziiertes Protein 9
Arnt	Ahr nuclear translocator
AST	Aspartat-Aminotransferase
BSA	Bovines Serumalbumin
c-SRC	Tyrosinkinase SRC
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DANN
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
ConA	Concanavalin A
CRP	C-reaktives Protein
CXCL9	CXC-Ligand 9
CYP	Cytochrom P450-Enzym
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DC	Dendritische Zelle
DER	Dioxin responsive element
DMSO	Dimethylsulfoxid
DV	Ductus venosus
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay
eNOS	endotheliale NOS
FCS	Fetal Calf Serum
FICZ	5,11-Dihydroindolo[3,2-b]carbazole-6-carboxaldehyde
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
g	Gram
GBSS	Gey's balanced salt solution
h	Stunde
HCL	Salzsäure
HE	Hämatoxilin-Eosin
Hsp90	heat shock protein 90
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IL	Interleukin

ILC	innate lymphoid cells
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IFN γ	Interferon γ
iNOS	induzierbare NOS
ITE	2-(1H-Indol-3-ylcarbonyl)-4-thiazolecarboxylicacidmethylester
KC	Kupffer-Zelle
KCL	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
KO	knock-out
LPS	Lipopolysaccharid
LSEC	sinusoidale Leberendothelzelle
LSEctin	Liver Sinusoidal Endothelial Cell Lectin
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Mililiter
mM	Milimol
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomograph
MS	Multiple Sklerose
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NF- κ B	Nuclear factor- κ B
ng	Nanogram
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NK	Natürliche Killerzelle
NKT	Natürliche Killer-T-Zelle
nm	Nanometer
nM	Nanomol
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthasen
NPC	Nicht-parenchymale Zelle
ns	nicht signifikant
OVA	Ovalbumin
PAMP	Pathogen Associated Molecular Patterns

PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	programmed cell death protein 1
PD-L1	programmed cell death 1 ligand 1
pg	Picogramm
PHT	portale Hypertonie
PRR	Pattern recognition receptor
PV	Portalvene
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RA	Retinolsäure
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
TCR	T-Zell-Rezeptor
TDO2	Tryptophan-2,3-Dioxygenase
TGF- β	Transforming growth factor β
TH	T-Helfer-Zelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TR1	Typ 1 regulatorische T-Zellen
TRegs	regulatorische T-Zellen
U	Units
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF α	Vascular Endothelial Growth Factor α
VE-H ₂ O	vollentsalztes Wasser
ZNS	Zentrales Nervensystems
μ l	Microliter
μ m	Micrometer
μ M	Micromol

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturmodell eines Zentralvenenläppchens (Lobulus hepatis).	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Lebersinusoid,	4
Abbildung 3: Übersicht über die Ahr-Signalwege.	14
Abbildung 4: FACS-Färbung von CD146 positiven Leber-NPCs (LSEC) auf Ahr.	45
Abbildung 5: TGF- β Konzentration in Zellkulturüberständen nach 20 h Inkubation mit 50 ng/ml LPS alleine, LPS und Toluol oder LPS und TCDD (25 nM oder 100 nM).	47
Abbildung 6: IL-6 Konzentration in Zellkulturüberständen nach 20 h Inkubation mit 10 ng/ml LPS alleine, LPS und Toluol oder LPS und 50 nM TCDD.	47
Abbildung 7: TGF- β Konzentration in Zellkulturüberständen nach 20 h Inkubation mit 50 ng/ml LPS alleine, LPS und HCL oder LPS und 50 μ M Kynurenin.	48
Abbildung 8: IL-6 Konzentration in Zellkulturüberständen nach 20 h Inkubation mit 10 ng/ml LPS alleine, LPS und HCL oder LPS und 50 μ M Kynurenin.	49
Abbildung 9: IL-6 Konzentration in Zellkulturüberständen nach 20 h Inkubation mit 10 ng/ml LPS, LPS und DMSO oder LPS und 100 mM FICZ.	50
Abbildung 10: IL-6 Konzentration in Zellkulturüberständen nach 20 h Inkubation mit 10 ng/ml LPS, LPS und Lösungsmittel DMSO oder LPS und 100nM ITE.	51
Abbildung 11: IL-6 Konzentration in Zellkulturüberständen nach 20 h Inkubation mit 50 ng/ml LPS, LPS und DMSO oder LPS und ITE (200 nM).	52
Abbildung 12: IL-6 Konzentration in Zellkulturüberständen nach 20 h Inkubation mit 10 ng/ml LPS, LPS und DMSO oder LPS und 30 μ M des Ahr-Inhibitors CH-223191.	53
Abbildung 13: IL-6 Konzentrationen von LPS (10 ng/ml) stimulierten LSECs.	55
Abbildung 14: Serumtransaminasen von mit LPS behandelten Ahr-defizienten Mäusen (Cdh-5 $^{\Delta/\Delta$ Ahr) und ihren Wurfgeschwistern (Ahr $^{fl/fl}$).	57
Abbildung 15: Serum IL-6 Konzentration von Ahr $^{fl/fl}$ und Cdh-5 $^{\Delta/\Delta$ Ahr Mäusen 20 h nach LPS-Gabe.	57
Abbildung 16: Relative Expression von IL-6 in Lebergewebe von Cdh-5 $^{\Delta/\Delta$ Ahr – im Vergleich zu Ahr $^{fl/fl}$ -Mäusen nach LPS-Behandlung.	58
Abbildung 17: Statistische Auswertung der Färbung von CD11c $^+$ CD146 $^-$ (a), CD11c $^-$ CD146 $^+$ (b) und CD11c / CD146 doppelt positiven (c) lebenden Leber-NPCs.	59
Abbildung 18: Statistische Auswertung der für die T-Zell-Aktivierung wichtigen Moleküle MHC II (a), CD86 (b) und CD80 (c) auf LSECs (CD146 $^+$).	60
Abbildung 19: V. portae und V. cava in situ von Ahr $^{fl/fl}$ - und Cdh-5 $^{\Delta/\Delta$ Ahr-Mäusen.	61
Abbildung 20: Relatives Verhältnis der Gefäßdurchmesser.	62
Abbildung 21: Mesenterialgefäße in situ von Ahr $^{fl/fl}$ - (links) und Cdh-5 $^{\Delta/\Delta$ Ahr-Mäusen (rechts).	62
	88

Abbildung 22: Milzen von $Ahr^{fl/fl}$ - (links) und $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Mäusen (rechts) im direkten Vergleich.	63
Abbildung 23: MRT-graphische Darstellung der Gefäße der einzelnen Leberlappen einer $Ahr^{fl/fl}$ - (oben) und einer $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Maus (unten).	64
Abbildung 24: HE-Färbung von Leberschnitten von $Ahr^{fl/fl}$ - (links) und $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Mäusen (rechts).	65
Abbildung 25: Sirius-Rot Färbung von Leberschnitten von $Ahr^{fl/fl}$ - (links) und $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Mäusen (rechts).	66
Abbildung 26: Immunfluoreszenzfärbung von LSECs / Endothel (CD146, rot), Gallengängen (CK19, grün) und Zellkernen (Dapi, blau).	67
Abbildung 27: Immunfluoreszenzfärbungen von Zellkernen (DAPI, blau) und $CD4^+$ Zellen (violett) in Leberschnitten von einer $Ahr^{fl/fl}$ - sowie einer $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Maus.	67
Abbildung 28: Relative Expression von VEGF α (a), iNOS (b) und eNOS (c) in $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Mäusen bezogen auf die relative Expression in $Ahr^{fl/fl}$ -Mäusen.	68
Abbildung 29: Transaminasen von 8 Wochen alten Tieren der Linie $Cdh-5^{\Delta/\Delta Ahr}$ und ihren Wurfgeschwistern.	69

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Geräte	23
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien	24
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Lösungen, Flüssigkeiten und Chemikalien	26
Tabelle 4: Übersicht und Zusammensetzung der verwendeten Puffer	28
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Antikörper	29
Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Kits	30
Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Sonden	30
Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Mauslinien	31
Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Software	32
Tabelle 10: PCR-Mastermix	40
Tabelle 11: PCR-Zyklus	40

11 Literaturverzeichnis

- APETOH, L., QUINTANA, F. J., POT, C., JOLLER, N., XIAO, S., KUMAR, D., BURNS, E. J., SHERR, D. H., WEINER, H. L. & KUCHROO, V. K. 2010. The Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) interacts with c-Maf to promote the differentiation of IL-27-induced regulatory type 1 (T(R)1) cells. *Nature immunology*, 11, 854-861.
- AUMÜLLER, G.-. 2020. *Anatomie*, Thieme.
- BANKOTI, J., BURNETT, A., NAVARRO, S., MILLER, A. K., RASE, B. & SHEPHERD, D. M. 2010a. Effects of TCDD on the fate of naive dendritic cells. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 115, 422-434.
- BANKOTI, J., RASE, B., SIMONES, T. & SHEPHERD, D. M. 2010b. Functional and phenotypic effects of AhR activation in inflammatory dendritic cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 246, 18-28.
- BARICZA, E., TAMASI, V., MARTON, N., BUZAS, E. I. & NAGY, G. 2016. The emerging role of aryl hydrocarbon receptor in the activation and differentiation of Th17 cells. *Cell Mol Life Sci*, 73, 95-117.
- BAUMANN, H. & GAULDIE, J. 1994. The acute phase response. *Immunology Today*, 15, 74-80.
- BEATTIE, L., PELTAN, A., MAROOF, A., KIRBY, A., BROWN, N., COLES, M., SMITH, D. F. & KAYE, P. M. 2010. Dynamic Imaging of Experimental Leishmania donovani-Induced Hepatic Granulomas Detects Kupffer Cell-Restricted Antigen Presentation to Antigen-Specific CD8(+) T Cells. *PLoS Pathogens*, 6, e1000805.
- BENSON, J. M. & SHEPHERD, D. M. 2011. Aryl Hydrocarbon Receptor Activation by TCDD Reduces Inflammation Associated with Crohn's Disease. *Toxicological Sciences*, 120, 68-78.
- BERTOLINO, P., TRESOL-BIEMONT MC FAU - RABOURDIN-COMBE, C. & RABOURDIN-COMBE, C. 1998. Hepatocytes induce functional activation of naive CD8+ T lymphocytes but fail to promote survival. *Eur J Immunol*, 28, 221-36.
- BESSEDE, A., GARGARO, M., PALLOTTA, M. T., MATINO, D., SERVILLO, G., BRUNACCI, C., BICCIATO, S., MAZZA, E. M., MACCHIARULO, A., VACCA, C., IANNITTI, R., TISSI, L., VOLPI, C., BELLADONNA, M. L., ORABONA, C., BIANCHI, R., LANZ, T. V., PLATTEN, M., DELLA FAZIA, M. A., PIOBBICO, D., ZELANTE, T., FUNAKOSHI, H., NAKAMURA, T., GILOT, D., DENISON, M. S., GUILLEMIN, G. J., DUHADAWAY, J. B., PRENDERGAST, G. C., METZ, R., GEFFARD, M., BOON, L., PIRRO, M., IORIO, A., VEYRET, B., ROMANI, L., GROHMANN, U., FALLARINO, F. & PUCCHETTI, P. 2014. Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defence pathway. *Nature*, 511, 184-90.
- BISWAS, S. K. & LOPEZ-COLLAZO, E. 2009. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends in Immunology*, 30, 475-487.
- BLOOM, S., KEMP, W. & LUBEL, J. 2015. Portal hypertension: pathophysiology, diagnosis and management. *Internal Medicine Journal*, 45, 16-26.
- BOGDANOS, D. P., GAO, B. & GERSHWIN, M. E. 2013. Liver immunology. *Compr Physiol*, 3, 567-98.
- BÖTTCHER, JAN P., SCHANZ, O., WOHLLEBER, D., ABDULLAH, Z., DEBEY-PASCHER, S., STARATSCHEK-JOX, A., HÖCHST, B., HEGENBARTH, S., GRELL, J., LIMMER, A., ATREYA, I., NEURATH, MARKUS F., BUSCH, DIRK H., SCHMITT, E., VAN ENDERT, P., KOLANUS, W., KURTS, C., SCHULTZE, JOACHIM L., DIEHL, L. & KNOLLE, PERCY A. 2013. Liver-Primed Memory T Cells Generated under Noninflammatory Conditions Provide Anti-infectious Immunity. *Cell Reports*, 3, 779-795.
- BREOUS, E., SOMANATHAN, S., VANDENBERGHE, L. H. & WILSON, J. M. 2009. Hepatic regulatory T cells and Kupffer cells are crucial mediators of systemic T cell tolerance to antigens targeting murine liver. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 50, 612-621.

- CALLERY, M. P., KAMEI, T. & FLYE, M. W. 1989. The effect of portacaval shunt on delayed-hypersensitivity responses following antigen feeding. *Journal of Surgical Research*, 46, 391-394.
- CALNE RY, S. R., PENA JR, ASHBY BS, HERBERTSON BM, MILLARD PR, DAVIS DR 1969. Toleragenic effects of porcine liver allografts. . *British Journal of Surgery*, 56, 692-708.
- CARAMBIA, A., FRENZEL, C., BRUNS, O. T., SCHWINGE, D., REIMER, R., HOHENBERG, H., HUBER, S., TIEGS, G., SCHRAMM, C., LOHSE, A. W. & HERKEL, J. 2013. Inhibition of inflammatory CD4 T cell activity by murine liver sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol*, 58, 112-8.
- CARAMBIA, A., FREUND, B., SCHWINGE, D., BRUNS, O. T., SALMEN, S. C., ITTRICH, H., REIMER, R., HEINE, M., HUBER, S., WAURISCH, C., EYCHMULLER, A., WRAITH, D. C., KORN, T., NIELSEN, P., WELLER, H., SCHRAMM, C., LUTH, S., LOHSE, A. W., HEEREN, J. & HERKEL, J. 2015. Nanoparticle-based autoantigen delivery to Treg-inducing liver sinusoidal endothelial cells enables control of autoimmunity in mice. *J Hepatol*, 62, 1349-56.
- CARAMBIA, A., FREUND, B., SCHWINGE, D., HEINE, M., LASCHTOWITZ, A., HUBER, S., WRAITH, D. C., KORN, T., SCHRAMM, C., LOHSE, A. W., HEEREN, J. & HERKEL, J. 2014. TGF-beta-dependent induction of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) Tregs by liver sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol*, 61, 594-9.
- CARAMBIA, A. & HERKEL, J. 2010. CD4 T cells in hepatic immune tolerance. *J Autoimmun*, 34, 23-8.
- CELLA, M. & COLONNA, M. 2015. Aryl hydrocarbon receptor: Linking environment to immunity. *Seminars in Immunology*, 27, 310-314.
- CRISPE, I. N. 2016. Hepatocytes as Immunological Agents. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 196, 17-21.
- DE CREUS, A., ABE, M., LAU, A. H., HACKSTEIN, H., RAIMONDI, G. & THOMSON, A. W. 2005. Low TLR4 Expression by Liver Dendritic Cells Correlates with Reduced Capacity to Activate Allogeneic T Cells in Response to Endotoxin. *The Journal of Immunology*, 174, 2037-2045.
- DELEVE, L. D. & MARETTI-MIRA, A. C. 2017. Liver Sinusoidal Endothelial Cell: An Update. *Seminars in liver disease*, 37, 377-387.
- DI MEGLIO, P., DUARTE, JOÃO H., AHLFORS, H., OWENS, NICK D. L., LI, Y., VILLANOVA, F., TOSI, I., HIROTA, K., NESTLE, FRANK O., MROWIETZ, U., GILCHRIST, MICHAEL J. & STOCKINGER, B. Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor Dampens the Severity of Inflammatory Skin Conditions. *Immunity*, 40, 989-1001.
- DIEHL, L., SCHURICH, A., GROCHTMANN, R., HEGENBARTH, S., CHEN, L. & KNOLLE, P. A. 2008. Tolerogenic maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7-homolog 1-dependent CD8+ T cell tolerance. *Hepatology*, 47, 296-305.
- DIENES, H. P., HÜTTEROTH, T., HESS, G. & MEUER, S. C. 1987. Immunoelectron microscopic observations on the inflammatory infiltrates and HLA antigens in hepatitis B and non-A, Non-B. *Hepatology*, 7, 1317-1325.
- FERNANDEZ-SALGUERO, P., PINEAU, P., HILBERT, D. M., MCPHAIL, T., LEE, S. S. T., KIMURA, S., NEBERT, D. W., RUDIKOFF, S., WARD, J. M. & J., G. F. 1995. Immune System Impairment and Hepatic Fibrosis in Mice Lacking the Dioxin-Binding Ah Receptor. *Science*, 268, 722-726.
- FERNANDEZ-SALGUERO, P. M., WARD, J. M., SUNDBERG, J. P. & GONZALEZ, F. J. 1997. Lesions of Aryl-hydrocarbon Receptor-deficient Mice. *Veterinary Pathology*, 34, 605-614.
- FONTENOT, J. D., GAVIN, M. A. & RUDENSKY, A. Y. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*, 4, 330-336.
- FÖRSTERMANN, U., POLLOCK, J. S. & NAKANE, M. 1993. Nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 3, 104-110.

- FRANCO, A., BARNABA, V., NATALI, P., BALSANO, C., MUSCA, A. & BALSANO, F. 1988. Expression of class I and class II major histocompatibility complex antigens on human hepatocytes. *Hepatology*, 8, 449-454.
- FRITSCH, E., SCHÄFER, C., CALLES, C., BERNSMANN, T., BERNSHAUSEN, T., WURM, M., HÜBENTHAL, U., CLINE, J. E., HAJIMIRAGHA, H., SCHROEDER, P., KLOTZ, L.-O., RANNUG, A., FÜRST, P., HANENBERG, H., ABEL, J. & KRUTMANN, J. 2007. Lightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 8851-8856.
- GILLESBY, B. E., STANOSTEFANO, M., PORTER, W., SAFE, S., WU, Z. F. & ZACHAREWSKI, T. R. 1997. Identification of a Motif within the 5' Regulatory Region of pS2 Which Is Responsible for AP-1 Binding and TCDD-Mediated Suppression. *Biochemistry*, 36, 6080-6089.
- GUIDO, M., ALVES, V. A. F., BALABAUD, C., BATHAL, P. S., BIOULAC-SAGE, P., COLOMBARI, R., CRAWFORD, J. M., DHILLON, A. P., FERRELL, L. D., GILL, R. M., HYTIROGLOU, P., NAKANUMA, Y., PARADIS, V., QUAGLIA, A., RAUTOU, P. E., THEISE, N. D., THUNG, S., TSUI, W. M. S., SEMPOUX, C., SNOVER, D., VAN LEEUWEN, D. J. & GROUP, T. I. L. P. S. 2019. Histology of portal vascular changes associated with idiopathic non-cirrhotic portal hypertension: nomenclature and definition. *Histopathology*, 74, 219-226.
- HALL, J. A., GRAINGER, J. R., SPENCER, S. P. & BELKAID, Y. 2011. The Role of Retinoic Acid in Tolerance and Immunity. *Immunity*, 35, 13-22.
- HARSTAD, E. B., GUYE, C. A., THOMAE, T. L. & BRADFIELD, C. A. 2006. Liver Deformation in $\text{Ahr}^{-/-}$ Mice: Evidence for Aberrant Hepatic Perfusion In Early Development. *Molecular Pharmacology*, 69, 1534.
- HERKEL, J., JAGEMANN, B., WIEGARD, C., LAZARO, J. F. G., LUETH, S., KANZLER, S., BLESSING, M., SCHMITT, E. & LOHSE, A. W. 2003. MHC class II-expressing hepatocytes function as antigen-presenting cells and activate specific CD4 T lymphocytes. *Hepatology*, 37, 1079-1085.
- HOLZ, L. E., BENSELER, V., BOWEN, D. G., BOUILLET, P., STRASSER, A., O'REILLY, L., D'AVIGDOR, W., BISHOP, A. G., MCCAUGHAN, G. W. & BERTOLINO, P. 2008. Intrahepatic murine CD8 T cell activation associates with a distinct phenotype leading to Bim-dependent death. *Gastroenterology*, 135, 989-997.
- HORI, S., NOMURA, T. & SAKAGUCHI, S. 2003. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science*, 299, 1057.
- HORST, A. K., NEUMANN, K., DIEHL, L. & TIEGS, G. 2016. Modulation of liver tolerance by conventional and nonconventional antigen-presenting cells and regulatory immune cells. *Cell Mol Immunol*, 13, 277-92.
- ILCHMANN, A., KRAUSE, M., HEILMANN, M., BURGDORF, S., VIETHS, S. & TODA, M. 2012. Impact of culture medium on maturation of bone marrow-derived murine dendritic cells via the aryl hydrocarbon receptor. *Molecular Immunology*, 51, 42-50.
- IWAKIRI, Y. 2007. The Molecules: Mechanisms of Arterial Vasodilatation Observed in the Splanchnic and Systemic Circulation in Portal Hypertension. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 41, S288-S294.
- JIANG, G., YANG, H.-R., WANG, L., WILDEY, G. M., FUNG, J., QIAN, S. & LU, L. 2008. Hepatic Stellate Cells Preferentially Expand Allogeneic CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) Regulatory T Cells in an IL-2 Dependent Manner. *Transplantation*, 86, 1492-1502.
- JINUSHI, M., TAKEHARA, T., TATSUMI, T., YAMAGUCHI, S., SAKAMORI, R., HIRAMATSU, N., KANTO, T., OHKAWA, K. & HAYASHI, N. 2007. Natural killer cell and hepatic cell interaction via NKG2A leads to dendritic cell-mediated induction of CD4(+) CD25(+) T cells with PD-1-dependent regulatory activities. *Immunology*, 120, 73-82.

- KERKVLIT, N. I., STEPPAN, L. B., VORACHEK, W., ODA, S., FARRER, D., WONG, C. P., PHAM, D. & MOURICH, D. V. 2009. Activation of aryl hydrocarbon receptor by TCDD prevents diabetes in NOD mice and increases Foxp3(+) T cells in pancreatic lymph nodes. *Immunotherapy*, 1, 539-547.
- KHANNA, A., MORELLI, A. E., ZHONG, C., TAKAYAMA, T., LU, L. & THOMSON, A. W. 2000. Effects of Liver-Derived Dendritic Cell Progenitors on Th1- and Th2-Like Cytokine Responses In Vitro and In Vivo. *The Journal of Immunology*, 164, 1346-1354.
- KIM, S.-H., HENRY, E. C., KIM, D.-K., KIM, Y.-H., SHIN, K. J., HAN, M. S., LEE, T. G., KANG, J.-K., GASIEWICZ, T. A., RYU, S. H. & SUH, P.-G. 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. *Molecular Pharmacology*, 69, 1871.
- KIMURA, A., NAKA, T., NAKAHAMA, T., CHINEN, I., MASUDA, K., NOHARA, K., FUJII-KURIYAMA, Y. & KISHIMOTO, T. 2009. Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses. *J Exp Med*, 206, 2027-35.
- KIMURA, A., NAKA, T., NOHARA, K., FUJII-KURIYAMA, Y. & KISHIMOTO, T. 2008. Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 9721-9726.
- KNOLL, P., SCHLAAK, J., UHRIG, A., KEMPF, P., ZUM BÜSCHENFELDE, K.-H. M. & GERKEN, G. 1995. Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *Journal of Hepatology*, 22, 226-229.
- KNOLLE, P. A., GERMANN, T., TREICHEL, U., UHRIG, A., SCHMITT, E., HEGENBARTH, S., LOHSE, A. W. & GERKEN, G. 1999a. Endotoxin Down-Regulates T Cell Activation by Antigen-Presenting Liver Sinusoidal Endothelial Cells. *The Journal of Immunology*, 162, 1401.
- KNOLLE, P. A., LÖSER, E., PROTZER, U., DUCHMANN, R., SCHMITT, E., ZUM BÜSCHENFELDE, K.-H. M., ROSE-JOHN, S. & GERKEN, G. 1997. Regulation of endotoxin-induced IL-6 production in liver sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells by IL-10. *Clinical and Experimental Immunology*, 107, 555-561.
- KNOLLE, P. A., SCHMITT E FAU - JIN, S., JIN S FAU - GERMANN, T., GERMANN T FAU - DUCHMANN, R., DUCHMANN R FAU - HEGENBARTH, S., HEGENBARTH S FAU - GERKEN, G., GERKEN G FAU - LOHSE, A. W. & LOHSE, A. W. 1999b. 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. *Gastroenterology*, 116, 1428-1440.
- KNOLLE, P. A., SCHMITT, E., JIN, S., GERMANN, T., DUCHMANN, R., HEGENBARTH, S., GERKEN, G. & LOHSE, A. W. 1999c. Induction of cytokine production in naive CD4⁺ T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward T_{h1} cells. *Gastroenterology*, 116, 1428-1440.
- KNOLLE, P. A. & WOHLLEBER, D. 2016. Immunological functions of liver sinusoidal endothelial cells. *Cell Mol Immunol*, 13, 347-53.
- KRUSE, N., NEUMANN, K., SCHRAGE, A., DERKOW, K., SCHOTT, E., ERBEN, U., KÜHL, A., LODDENKEMPER, C., ZEITZ, M., HAMANN, A. & KLUGEWITZ, K. 2009. Priming of CD4⁺ T cells by liver sinusoidal endothelial cells induces CD25^{low} forkhead box protein 3⁻ regulatory T cells suppressing autoimmune hepatitis. *Hepatology*, 50, 1904-1913.
- LAHVIS, G. P., LINDELL, S. L., THOMAS, R. S., MCCUSKEY, R. S., MURPHY, C., GLOVER, E., BENTZ, M., SOUTHARD, J. & BRADFIELD, C. A. 2000. Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 10442-10447.

- LAHVIS, G. P., PYZALSKI, R. W., GLOVER, E., PITOT, H. C., MCELWEE, M. K. & BRADFIELD, C. A. 2005. The Aryl Hydrocarbon Receptor Is Required for Developmental Closure of the Ductus Venosus in the Neonatal Mouse. *Molecular Pharmacology*, 67, 714.
- LEE, W.-Y., MORIARTY, T. J., WONG, C. H. Y., ZHOU, H., STRIETER, R. M., VAN ROOIJEN, N., CHACONAS, G. & KUBES, P. 2010. An intravascular immune response to *Borrelia burgdorferi* involves Kupffer cells and iNKT cells. *Nature immunology*, 11, 295-302.
- LI, W., DONAT, S., DOHR, O., UNFRIED, K. & ABEL, J. 1994. Ah Receptor in Different Tissues of C57BL/6J and DBA/2J Mice: Use of Competitive Polymerase Chain Reaction to Measure Ah-Receptor mRNA Expression. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315, 279-284.
- LIFE TECHNOLOGIES 2016. Real-time PCR handbook. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/global/forms/real-time-pcr-handbook-download-request-form/thank-you.html?email=christoph.lom@web.de&status=500&form-submit-token=c774473e6e2a99d5d9491ce37986acd&form-submit-id=63386>: Thermo Fisher Scientific Inc.
- LIU, W., TANG, L., ZHANG, G., WEI, H., CUI, Y., GUO, L., GOU, Z., CHEN, X., JIANG, D., ZHU, Y., KANG, G. & HE, F. 2004. Characterization of a Novel C-type Lectin-like Gene, LSEctin: DEMONSTRATION OF CARBOHYDRATE BINDING AND EXPRESSION IN SINUSOIDAL ENDOTHELIAL CELLS OF LIVER AND LYMPH NODE. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 18748-18758.
- LOHSE, A. W., KNOLLE, P. A., BILO, K., UHRIG, A., WALDMANN, C., IBE, M., SCHMITT, E., GERKEN, G. & MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K. 1996. Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells. *Gastroenterology*, 110, 1175-1181.
- MATSUMURA, F. 2009. The significance of the nongenomic pathway in mediating inflammatory signaling of the dioxin-activated Ah receptor to cause toxic effects. *Biochemical Pharmacology*, 77, 608-626.
- MEZRICH, J. D., FECHNER, J. H., ZHANG, X., JOHNSON, B. P., BURLINGHAM, W. J. & BRADFIELD, C. A. 2010. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J Immunol*, 185, 3190-8.
- NGUYEN, L. P. & BRADFIELD, C. A. 2008. The Search for Endogenous Activators of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Chemical research in toxicology*, 21, 102-116.
- NGUYEN, N. T., KIMURA, A., NAKAHAMA, T., CHINEN, I., MASUDA, K., NOHARA, K., FUJII-KURIYAMA, Y. & KISHIMOTO, T. 2010. Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 19961-19966.
- ÖBERG, M., BERGANDER, L., HÅKANSSON, H., RANNUG, U. & RANNUG, A. 2005. Identification of the Tryptophan Photoproduct 6-Formylindolo[3,2-b]carbazole, in Cell Culture Medium, as a Factor That Controls the Background Aryl Hydrocarbon Receptor Activity. *Toxicological Sciences*, 85, 935-943.
- OHTAKE, F., BABA, A., TAKADA, I., OKADA, M., IWASAKI, K., MIKI, H., TAKAHASHI, S., KOUZMENKO, A., NOHARA, K., CHIBA, T., FUJII-KURIYAMA, Y. & KATO, S. 2007. Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature*, 446, 562-566.
- PROBST, H. C., MCCOY, K., OKAZAKI, T., HONJO, T. & VAN DEN BROEK, M. 2005. Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat Immunol*, 6, 280-286.
- QUINTANA, F. J., BASSO, A. S., IGLESIAS, A. H., KORN, T., FAREZ, M. F., BETTELLI, E., CACCAMO, M., OUKKA, M. & WEINER, H. L. 2008. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, 453, 65-71.

- QUINTANA, F. J., MURUGAIYAN, G., FAREZ, M. F., MITSDOERFFER, M., TUKPAH, A. M., BURNS, E. J. & WEINER, H. L. 2010. An endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand acts on dendritic cells and T cells to suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 20768-73.
- QUINTANA, F. J. & SHERR, D. H. 2013. Aryl hydrocarbon receptor control of adaptive immunity. *Pharmacol Rev*, 65, 1148-61.
- RACANELLI, V. & REHERMANN, B. 2006. The liver as an immunological organ. *Hepatology*, 43, S54-62.
- RONCAROLO, M. G., GREGORI S FAU - BATTAGLIA, M., BATTAGLIA M FAU - BACCHETTA, R., BACCHETTA R FAU - FLEISCHHAUER, K., FLEISCHHAUER K FAU - LEVINGS, M. K. & LEVINGS, M. K. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans.
- SARAIVA, M. & O'GARRA, A. 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*, 10, 170-181.
- SCHILDBERG, F. A., HEGENBARTH, S. I., SCHUMAK, B., LIMMER, A. & KNOLLE, P. A. 2008. Liver sinusoidal endothelial cells veto CD8 T cell activation by antigen-presenting dendritic cells. *European Journal of Immunology*, 38, 957-967.
- SCHMIDT, J. V., SU, G. H., REDDY, J. K., SIMON, M. C. & BRADFIELD, C. A. 1996. Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 6731-6736.
- SCHOUTEN, J. N. L., VERHEIJ, J. & SEIJO, S. 2015. Idiopathic non-cirrhotic portal hypertension: a review. *Orphanet journal of rare diseases*, 10, 67-67.
- SCHURICH, A., BERG, M., STABENOW, D., BÖTTCHER, J., KERN, M., SCHILD, H.-J., KURTS, C., SCHUETTE, V., BURGDORF, S., DIEHL, L., LIMMER, A. & KNOLLE, P. A. 2010. Dynamic Regulation of CD8 T Cell Tolerance Induction by Liver Sinusoidal Endothelial Cells. *The Journal of Immunology*, 184, 4107-4114.
- SHETH K, B. P. 2001. The liver as an immune organ. *Curr Opin Crit Care*, 7, 99-104.
- SHETTY, S., LALOR, P. F. & ADAMS, D. H. 2018. Liver sinusoidal endothelial cells — gatekeepers of hepatic immunity. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 15, 555-567.
- SHIN, J. H., ZHANG, L., MURILLO-SAUCA, O., KIM, J., KOHRT, H. E. K., BUI, J. D. & SUNWOO, J. B. 2013. Modulation of natural killer cell antitumor activity by the aryl hydrocarbon receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 12391-12396.
- SIMONES, T. & SHEPHERD, D. M. 2011. Consequences of AhR activation in steady-state dendritic cells. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 119, 293-307.
- SMITH, K. J., MURRAY, I. A., TANOS, R., TELLEW, J., BOITANO, A. E., BISSON, W. H., KOLLURI, S. K., COOKE, M. P. & PERDEW, G. H. 2011. Identification of a High-Affinity Ligand That Exhibits Complete Aryl Hydrocarbon Receptor Antagonism. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 338, 318-327.
- STONE, T. W., STOY, N. & DARLINGTON, L. G. An expanding range of targets for kynurenine metabolites of tryptophan. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34, 136-143.
- TANG, L., YANG, J., LIU, W., TANG, X., CHEN, J., ZHAO, D., WANG, M., XU, F., LU, Y., LIU, B., SUN, Q., ZHANG, L. & HE, F. 2009. Liver Sinusoidal Endothelial Cell Lectin, LSEctin, Negatively Regulates Hepatic T-Cell Immune Response. *Gastroenterology*, 137, 1498-1508.e5.
- THOMSON, A. W. & KNOLLE, P. A. 2010. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat Rev Immunol*, 10, 753-66.
- THOMSON, A. W. & LU, L. 1999. Are dendritic cells the key to liver transplant tolerance? *Immunology Today*, 20, 27-32.

- TIAN, Y., KE, S., DENISON, M. S., RABSON, A. B. & GALLO, M. A. 1999. Ah Receptor and NF- κ B Interactions, a Potential Mechanism for Dioxin Toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 510-515.
- UHRIG, A., BANAFSCHE, R., KREMER, M., HEGENBARTH, S., HAMANN, A., NEURATH, M., GERKEN, G., LIMMER, A. & KNOLLE, P. A. 2005. Development and functional consequences of LPS tolerance in sinusoidal endothelial cells of the liver. *J Leukoc Biol*, 77, 626-33.
- VELDHOEN, M., HIROTA, K., CHRISTENSEN, J., O'GARRA, A. & STOCKINGER, B. 2009. Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 206, 43-49.
- VELDHOEN, M., HIROTA, K., WESTENDORF, A. M., BUER, J., DUMOUTIER, L., RENAULD, J.-C. & STOCKINGER, B. 2008. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature*, 453, 106-109.
- VOGEL, C. F. A., GOTH, S. R., DONG, B., PESSAH, I. N. & MATSUMURA, F. 2008. Aryl hydrocarbon receptor signaling mediates expression of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Biochemical and biophysical research communications*, 375, 331-335.
- WAGAGE, S., JOHN, B., KROCK, B. L., HALL, A. O. H., RANDALL, L. M., KARP, C. L., SIMON, M. C. & HUNTER, C. A. 2014. The aryl hydrocarbon receptor promotes IL-10 production by natural killer cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 192, 1661-1670.
- WALISSER, J. A., GLOVER, E., PANDE, K., LISS, A. L. & BRADFIELD, C. A. 2005. Aryl hydrocarbon receptor-dependent liver development and hepatotoxicity are mediated by different cell types. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 17858-63.
- WARREN, A., LE COUTEUR, D. G., FRASER, R., BOWEN, D. G., MCCAUGHAN, G. W. & BERTOLINO, P. 2006. T lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology*, 44, 1182-90.
- WEI, P., HU, G.-H., KANG, H.-Y., YAO, H.-B., KOU, W., LIU, H., ZHANG, C. & HONG, S.-L. 2014. An aryl hydrocarbon receptor ligand acts on dendritic cells and T cells to suppress the Th17 response in allergic rhinitis patients. *Laboratory Investigation*, 94, 528.
- WIEGARD, C., WOLINT, P., FRENZEL, C., CHERUTI, U., SCHMITT, E., OXENIUS, A., LOHSE, A. W. & HERKEL, J. 2007 Defective T Helper Response of Hepatocyte-Stimulated CD4 T Cells Impairs Antiviral CD8 Response and Viral Clearance. *Gastroenterology*, 133, 2010-2018.
- WINAU, F., HEGASY, G., WEISKIRCHEN, R., WEBER, S., CASSAN, C., SIELING, P. A., MODLIN, R. L., LIBLAU, R. S., GRESSNER, A. M. & KAUFMANN, S. H. E. 2007. Ito Cells Are Liver-Resident Antigen-Presenting Cells for Activating T Cell Responses. *Immunity*, 26, 117-129.
- WOHLLEBER, D., KASHKAR, H., GÄRTNER, K., FRINGS, MARIANNE K., ODENTHAL, M., HEGENBARTH, S., BÖRNER, C., ARNOLD, B., HÄMMERLING, G., NIESWANDT, B., VAN ROOIJEN, N., LIMMER, A., CEDERBRANT, K., HEIKENWALDER, M., PASPARAKIS, M., PROTZER, U., DIENES, H.-P., KURTS, C., KRÖNKE, M. & KNOLLE, PERCY A. 2012. TNF-Induced Target Cell Killing by CTL Activated through Cross-Presentation. *Cell Reports*, 2, 478-487.
- WOHLLEBER, D. & KNOLLE, P. A. 2016. The role of liver sinusoidal cells in local hepatic immune surveillance. *Clin Transl Immunology*, 5, e117.
- WONG, J., JOHNSTON, B., LEE, S. S., BULLARD, D. C., SMITH, C. W., BEAUDET, A. L. & KUBES, P. 1997. A minimal role for selectins in the recruitment of leukocytes into the inflamed liver microvasculature. *Journal of Clinical Investigation*, 99, 2782-2790.
- YANG, R., LIU, Q., GROSFELD, J. L. & PESCOVITZ, M. D. 1994. Intestinal venous drainage through the liver is a prerequisite for oral tolerance induction. *Journal of Pediatric Surgery*, 29, 1145-1148.

- YESTE, A., NADEAU, M., BURNS, E. J., WEINER, H. L. & QUINTANA, F. J. 2012. Nanoparticle-mediated codelivery of myelin antigen and a tolerogenic small molecule suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 11270-11275.
- YLÄ-HERTTUALA, S., RISSANEN, T. T., VAJANTO, I. & HARTIKAINEN, J. 2007. Vascular Endothelial Growth Factors: Biology and Current Status of Clinical Applications in Cardiovascular Medicine. *Journal of the American College of Cardiology*, 49, 1015-1026.
- YOU, Q., CHENG, L., KEDL, R. M. & JU, C. 2008. Mechanism of T Cell Tolerance Induction by Murine Hepatic Kupffer Cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 48, 978-990.
- YU, M.-C., CHEN, C.-H., LIANG, X., WANG, L., GANDHI, C. R., FUNG, J. J., LU, L. & QIAN, S. 2004. Inhibition of T-cell responses by hepatic stellate cells via B7-H1-mediated T-cell apoptosis in mice. *Hepatology*, 40, 1312-1321.
- ZHANG, L., MA, J., TAKEUCHI, M., USUI, Y., HATTORI, T., OKUNUKI, Y., YAMAKAWA, N., KEZUKA, T., KURODA, M. & GOTO, H. 2010. Suppression of Experimental Autoimmune Uveoretinitis by Inducing Differentiation of Regulatory T Cells via Activation of Aryl Hydrocarbon Receptor. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51, 2109-2117.
- ZHANG, S., QIN, C. & SAFE, S. H. 2003. Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: effects of structure and cell context. *Environmental health perspectives*, 111, 1877-1882.
- ZHAO, B., DEGROOT, D. E., HAYASHI, A., HE, G. & DENISON, M. S. 2010. CH223191 Is a Ligand-Selective Antagonist of the Ah (Dioxin) Receptor. *Toxicological Sciences*, 117, 393-403.

12 Danksagung

Eine medizinische Dissertation ist, wie jede wissenschaftliche Arbeit, nie das Erzeugnis eines Einzelnen. Wie die Versorgung von Patienten im Krankenhaus ist auch eine solche Arbeit das Ergebnis von Teamwork und einer produktiven und vertrauensvollen Zusammenarbeit. Daher gilt mein ganz besonderer Dank den Menschen, die mich in meiner Zeit im Labor aber auch während des Schreibprozesses zu Hause am Schreibtisch unterstützt haben.

Zuallererst möchte ich mich daher bei meiner Betreuerin Dr. rer. nat. Antonella Carambia und meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Johannes Herkel für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung und Unterstützung sowohl in der aktiven Labor- als auch in der etwas langwierigen Schreibphase bedanken. Gerade die ausführlichen und regelmäßigen Treffen haben durch ihren Input und durch ständiges kritisches Hinterfragen sowie Verbesserungsvorschläge diese Arbeit in dieser Form erst ermöglicht. In diesem Zusammenhang gilt mein Dank auch dem Graduiertenkolleg des SFB 841 für die gewährte finanzielle Unterstützung und die begleitende strukturierte Fortbildung. Des Weiteren gilt mein Dank den weiteren Mitgliedern des Labors, wobei ich insbesondere Gela Schmidt, Sabrina Kreß, Jennifer Wigger und Marko Hilken für die hervorragende technische Unterstützung und der AG Schramm in Person von Prof. Dr. med. Christoph Schramm und Dr. rer. nat. Dorothee Schwinge für die wissenschaftliche Unterstützung zu Dank verpflichtet bin.

Nicht zu vergessen sind auch die vielen netten Kollegen und Mitdoktoranden, die meine Promotionszeit nicht nur wissenschaftlich zu einer besonderen Zeit gemacht haben.

Des Weiteren möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Frau für die ununterbrochene Unterstützung und den seelischen Support während der gesamten Zeit bedanken.

Meiner Mutter und meiner Cousine gebührt der Dank für die ausführliche Rechtschreibkorrektur.

Last but not least danke ich von Herzen meinen Eltern, die immer mit einer Selbstverständlichkeit meine schulische, universitäre und wissenschaftliche Ausbildung unterstützt haben.

13 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

14 Eidesstattliche Versicherung

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

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

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

Unterschrift: 