



Universität Hamburg
DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG



Die Rolle des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors bei APAP-induzierter Leberschädigung

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie der
Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Fenja Amrei Schuran
aus Kiel

Hamburg, Januar 2022

Vorwort: Diese Studie wurde zwischen August 2017 und Dezember 2021 am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf in der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik im Forschungslabor Immunregulation und Entzündung der Leber von Prof. Dr. Johannes Herkel mit dem Projektvorhaben P03 des SFB 841 unter der Projektleitung von Dr. Antonella Carambia durchgeführt. Die Forschungsergebnisse und die Zusammenfassung der vorliegenden Arbeit wurden im folgenden Artikel vorab publiziert: Schuran FA, Lommetz C, Steudter A, Ghallab A, Wieschendorf B, Schwinge D, Zuehlke S, Reinders J, Heeren J, Lohse AW, Schramm C, Herkel J, Carambia A. Aryl Hydrocarbon Receptor Activity in Hepatocytes Sensitizes to Hyperacute Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Mice. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2021;11(2):371-388. doi: 10.1016/j.jcmgh.2020.09.002.

1. Gutachter: Prof. Dr. Johannes Herkel
I. Medizinische Klinik und Poliklinik
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

2. Gutachter: Jun.-Prof. Dr. Esther Diekhof
Institut für Zoologie, Neuroendokrinologie
Universität Hamburg

Tag der Disputation: 20.05.2022

Für Opa Doni

Günther Kruse

*7.6.1926 †25.10.2021

GESANG DER GEISTER ÜBER DEN WASSERN

Des Menschen Seele
gleicht dem Wasser:
Vom Himmel kommt es,
zum Himmel steigt es,
und wieder nieder
zur Erde muß es,
ewig wechselnd.

Strömt von der hohen,
steilen Felswand
der reine Strahl,
dann stäubt er lieblich
in Wolkenwellen
zum glatten Fels,
und leicht empfangen
wallt er verschleiernd,
leisrauschend,
zur Tiefe nieder.

Ragen Klippen
dem Sturz entgegen,
schäumt er unmutig
stufenweise
zum Abgrund.

Im flachen Bette
schleicht er das Wiesental hin,
und in dem glatten See
weiden ihr Antlitz
alle Gestirne.

Wind ist der Welle
lieblicher Buhler;
Wind mischt vom Grund aus
schäumende Wogen.

Seele des Menschen,
wie gleichst du dem Wasser!
Schicksal des Menschen,
wie gleichst du dem Wind!

JOHANN WOLFGANG VON GOETHE

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	V
Zusammenfassung.....	VI
Summary.....	VII
1. Einleitung	1
1.1 AUFBAU UND FUNKTION DER LEBER.....	1
1.1.1 Anatomischer Aufbau.....	1
1.1.2 Mikroanatomischer Aufbau.....	2
1.1.3 Die Darm-Leber-Achse	4
1.1.4 Die Leber als Immunorgan	5
1.2 ACETAMINOPHEN-INDUZIERTER LEBERSCHÄDIGUNG	6
1.2.1 Epidemiologie.....	6
1.2.2 APAP-Hepatotoxizität.....	8
1.2.3 Apoptose und Nekrose	9
1.2.4 Immunmechanismen.....	11
1.2.5 Risikofaktoren	14
1.3 DER TRANSKRIPTIONSFAKTOR ARYL-HYDROCARBON-REZEPTOR (AHR)	16
1.3.1 Die Signalwege des Ahr	16
1.3.2 Ahr-Liganden.....	19
1.3.3 Physiologische Funktionen des Ahr.....	21
1.3.4 Ahr als therapeutisches Zielmolekül.....	23
1.4 ZIEL DER STUDIE	24
2. Material & Methoden.....	26
2.1 MATERIALIEN	26
2.1.2 Geräte.....	26
2.1.3 Materialien.....	27
2.1.4 Substanzen.....	28
2.1.5 Kits.....	30
2.1.6 Antikörper.....	30
2.1.7 TaqMan-Sonden für die quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR) von Thermo Fisher Scientific.....	31
2.1.8 Puffer.....	31
2.1.9 Software	32
2.2 METHODEN	33
2.2.1 Versuchstiere.....	33
2.2.2 Applikation von Ahr-Liganden.....	34
2.2.3 Induktion einer APAP-induzierten Leberschädigung.....	34
2.2.4 Serumgewinnung und Transaminasenbestimmung	35
2.2.5 Leberhistologie	36
2.2.6 Proteinnachweis mittels Western Blot.....	41
2.2.7 RNA-Isolation und quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	44
2.2.8 Bestimmung der GSH-Level in der Leber	45
2.2.9 Bestimmung von APAP-Addukten.....	45
2.2.10 Isolation von nicht-parenchymalen Leberzellen.....	45

2.2.11 Isolation von Kupffer-Zellen.....	46
2.2.12 Durchflusszytometrie.....	47
2.2.13 Statistische Auswertung.....	49
3. Ergebnisse	50
3.1 KONSEQUENZEN DER AHR-AKTIVIERUNG IM MODELL DER APAP-INDUZIERTEN LEBERSCHÄDIGUNG	50
3.1.1 Die Ahr-Aktivierung durch den Liganden ITE induziert eine hyperakute APAP- Hepatotoxizität.....	50
3.1.2 Eine Ahr-Aktivierung fördert die Akkumulation toxischer APAP-Metabolite .	54
3.1.3 Die Ahr-vermittelte hyperakute APAP-Hepatotoxizität ist mit einer erhöhten Entzündungsreaktion verbunden	59
3.1.4 Die Ahr-vermittelte hyperakute APAP-Hepatotoxizität ist geschlechts- unabhängig	62
3.1.5 Die ITE-vermittelte Ahr-Aktivierung in myeloischen Zellen verschlimmert die Acetaminophen-induzierte Leberschädigung nicht.....	64
3.1.6 Die Ahr-Aktivierung in Hepatozyten ist verantwortlich für die ITE-vermittelte Induktion der hyperakuten APAP-Hepatotoxizität.....	69
3.1.7 Bereits bei niedriger APAP-Dosierung kann eine Ahr-Aktivierung hepatozelluläre Schäden induzieren	78
3.2 DIE AHR-AKTIVIERUNG DURCH DAS TRYPTOPHAN-DERIVAT FICZ IM APAP-MODELL	81
4. Diskussion	85
4.1 DIE AHR-AKTIVIERUNG INDUZIERT EINE HYPERAKUTE APAP-HEPATOTOXIZITÄT	85
4.2 ZELLSPEZIFISCHE AHR-DEFIZIENZ IN HEPATOZYTEN SCHÜTZT VOR HYPERAKUTER APAP-TOXIZITÄT	88
4.3 EINE AHR-AKTIVIERUNG INDUZIERT BEREITS BEI THERAPEUTISCHEN APAP-DOSEN HEPATOZELLULÄRE SCHÄDEN	90
4.4. SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	91
5. Literatur	94
Kongressbeiträge	IX
Publikationen.....	X
Danksagung.....	XI
Eidesstattliche Erklärung.....	XIII

Abkürzungsverzeichnis

ACK	Ammoniumchlorid-Kalium
Ahr	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
Ahrr	Ahr-Repressor
AIP	Ahr-interagierendes Protein
ALT	Alanin-Aminotransferase
APAP	Acetaminophen
APC	Antigen presenting cell (Antigenpräsentierende Zelle)
ARNT	Ahr-nuclear-translocator (Ahr-Kerntranslokator)
AST	Aspartat-Aminotransferase
bHLH	Basic helix-loop-helix (basische Helix-Schleifen-Helix)
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL2	CC-chemokine ligand 2 (Monozyten chemotaktisches Protein 1)
CD	Cluster of Differentiation (Cluster der Differenzierung/Unterscheidungsgruppen)
cDNA	Complementary DNA (Komplementäre DNA)
CUL4B	Cullin-4B-Ubiquitin-Ligase-Komplex
Cyp	Cytochrom P450
CYS	Cystein
DAMP	Damage associated molecular pattern (Schäden-assoziierte molekulare Struktur)
DC	Dendritic cell (Dendritische Zelle)
DIM	3,3'-Diindolylmethan
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease
DRE	Dioxin response element (Dioxin-Reaktionselement)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESR	Estrogen receptor (Östrogenrezeptor)
FACS	Fluorescence-activated cell sorting (Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung)
FCS	Fetal calf serum (Fetales Kälberserum)
FICZ	5,11-Dihydroindolo[3,2-b]carbazole-6-carboxaldehyde
FSC	Forward scatter (Vorwärtsstreuung des Lichts)
GF	Germfree (Keimfrei)
GLC	Glucuronid
GLUC	UDP-Glucuronosyltransferase
GSH	Glutathion
H&E	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIF1 α	Hypoxia-inducible factor 1 α (Hypoxieinduzierbarer Faktor 1 α)
HMGB	High-Mobility Group Box Protein 1
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HSC	Hepatic stellate cells (Hepatische Sternzelle)
HSP90	Heatshock protein (Hitzeschockprotein)
I3A	Indol-3-Acetat
I3C	Indol-3-Carbinol
ICZ	Indolo[3,4-b]-Carbazol
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IDO1	Indolamin-2,3-Dioxygenase 1
IL	Interleukin

ILC	Innate lymphoid cell (Angeborene lymphatische Zelle)
ITE	2-(1H-Indol-3-ylcarbonyl)-4-thiazolecarboxylicacidmethylester
KC	Kupffer cell (Kupffer-Zelle)
KO	Knockout
Kyn	Kynurenin
LPS	Lipopolysaccharid
LSEC	Liver sinusoidal endothelial cell (Leber sinusoidale Endothelzelle)
LTr1	2-(Indol-3-ylmethyl)-indol-3-yl]-Indol-3-ylmethan
MACS	Magnetic-activated cell sorting (Magnetisch-aktiviertes Zellsortierungsverfahren)
MHC	Major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
miRN	Micro RNA (Mikro RNA)
MoMF	Monocyte-derived macrophage (Monozyten-abgeleitete Makrophage)
MPT	Mitochondrialer Permeabilitätsübergang
mRNA	Messenger RNA (Boten-RNA)
NAC	N-Acetylcystein (obsolet: Mercaptursäure)
NAPQI	N-Acetyl-para-benzo-chinon-imin
NFκB	NuklearfaktorκB
NK	Natural killer cell (Natürliche Killerzelle)
NKT	Natural killer T-cell (Natürliche Killer T-Zelle)
NPC	Non-parenchymal cell (Nicht-parenchymale Zelle)
OD	Optische Dichte
PacO	Pacific Orange™ Succinimidyl Ester
PAS	PER-ARNT-SIM
PBS	Phosphate-buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PFA	Paraformaldehyd-Lösung
PRR	Pattern recognition receptor (Mustererkennungszepetor)
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RA	Retinsäure
rAAV	Rekombinante Adeno-assoziierte Viren
Rel	Transkriptionsfaktor p65
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
siRNA	Small interfering RNA (kurze RNA Fragmente)
SOCS2	Suppressor of cytokine signaling 2 (Suppressor der Zytokinsignalisierung 2)
SSC	Sidewards scatter (Seitwärtsstreuung des Lichts)
SUL	Sulfat
SULT	Sulfotransferase
TBS	Tris-buffered saline (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)
TBST	Tris-buffered saline with Tween20 (Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20)
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin
TDO	Tryptophan-2,3-Dioxygenase
TH	T-helper cell (T-Helferzelle)
TLR	Toll-like receptor (Toll-like-Rezeptor)
TNF	Tumor necrosis factor (Tumornekrosefaktor)
TUNE	Terminal deoxanucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
WT	Wild type (Wildtyp)
XRE	Xenobiotic response element (Xenobiotisches Reaktionselement)

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Mikroanatomischer Aufbau der Leber	3
Abb. 2: APAP-Metabolismus und -Toxizität	9
Abb. 3: Immunmechanismen der APAP-induzierten Leberschädigung	13
Abb. 4: Individuelle Risikofaktoren können für eine APAP-Toxizität prädisponieren	15
Abb. 5: Ahr-Signalwege	18
Abb. 6: Experimentelles Setup	35
Abb. 7: Exemplarische Darstellung der angewandten Gating-Strategie zur Auswertung durchflusszytometrisch erhobener Daten	49
Abb. 8: Die Ahr-Aktivierung durch ITE induziert in Kombination mit APAP eine hyperakute Leberschädigung	51
Abb. 9: Betrachtung der Leberschädigung auf feingeweblicher Ebene	52
Abb. 10: Zelltod infolge von APAP-Intoxikation und Ahr-Aktivierung durch ITE	54
Abb. 11: Hepatische RNA-Expression von Ahr und den APAP-metabolisierenden Enzymen Cyp1a1, Cyp1a2 und Cyp2e1	55
Abb. 12: Analyse von Cyp1a2 und Cyp2e1 auf Proteinebene	57
Abb. 13: APAP-Metabolisierung	58
Abb. 14: Hepatische Genexpression von Monozyten- und Neutrophilen-Markern	59
Abb. 15: Durchflusszytometrische Analyse der leberinfiltrierenden CD11b+ LY6C ^{hi} Monozyten und CD11b+LY6C ^{hi} LY6C ^{int} Neutrophilen	61
Abb. 16: Hepatische Genexpression von Entzündungsmediatoren	62
Abb. 17: Der ITE-vermittelte hyperakute Verlauf der APAP-induzierten Leberschädigung ist bei beiden Geschlechtern ähnlich	64
Abb. 18: Kein Einfluss von Ahr in myeloischen Zellen auf die APAP-Hepatotoxizität	65
Abb. 19: Keine Relevanz der ITE-vermittelten Ahr-Aktivierung in myeloischen Zellen für den Verlauf der Acetaminophen-induzierten Leberschädigung	66
Abb. 20: Äquivalente Gewebeschäden in LysM ^{Δ/ΔAhr} -Mäusen und ihren Wurfgeschwistern nach Ahr-Aktivierung und APAP-Intoxikation	68
Abb. 21: Keine unterschiedliche Infiltration von entzündlichen Monozyten oder Neutrophilen in LysM ^{Δ/ΔAhr} -Mäusen und ihren Wurfgeschwistern	69
Abb. 22: Prüfung der Alb ^{Δ/ΔAhr} -Defizienz und ihrer Auswirkung in der APAP-Hepatotoxizität	70
Abb. 23: Die ITE-vermittelte Induktion der hyperakuten APAP-Hepatotoxizität ist abhängig von der Ahr-Aktivierung in Hepatozyten	71
Abb. 24: Reduzierte Gewebeschäden in Alb ^{Δ/ΔAhr} -Mäusen nach Ahr-Aktivierung und APAP-Intoxikation	73
Abb. 25: Geringere Expression der APAP-metabolisierenden Enzyme Cyp1a2 und Cyp2e1 in Alb ^{Δ/ΔAhr} -Mäusen bei der ITE-vermittelten hyperakuten APAP-Hepatotoxizität	75

Abb. 26: Schutz vor einer ITE-vermittelten hyperakuten APAP-induzierten Leberschädigung in Alb ^{Δ/ΔAhr} -Mäusen durch eine verminderte Akkumulation toxischer APAP-Addukte.....	76
Abb. 27: Ausbleibende hyperakute APAP-Hepatotoxizität in Alb ^{Δ/ΔAhr} -Mäusen ist mit einer geringeren Expression von Entzündungsmediatoren verbunden	77
Abb. 28: Ahr-Aktivierung im APAP-Dosis-Eskalations-Experiment.....	79
Abb. 29: ITE-Dosis-Eskalations-Experiment im APAP-Modell	81
Abb. 30: Die Ahr-Aktivierung durch FICZ induziert hyperakute APAP-Leberschäden.....	82
Abb. 31: Eine FICZ-induzierte Ahr-Aktivierung fördert die Expression des APAP-metabolisierenden Enzyms Cyp1a2	83
Abb. 32: Die FICZ-induzierte Exazerbation der APAP-Toxizität ist mit erhöhten Entzündungsmediatoren verbunden	84
Abb. 33: Schematische Zusammenfassung der Wechselwirkungen von Ahr-Aktivierung und APAP	91

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Auflistung der verwendeten Mauslinien	34
Tab. 2: Entwässerungsprotokoll der Pathologie UKE.....	36
Tab. 5: Zusammensetzung der Gele für die diskontinuierliche SDS Polyacrylamid- Gelelektrophorese	42
Tab. 3: Programm zum Umschreiben der mRNA in cDNA.....	44
Tab. 4: qPCR Protokoll des ViiA 7 Real-Time PCR-Systems	44

Zusammenfassung

HINTERGRUND & ZIELE: Die durch Acetaminophen (APAP) verursachte Leberschädigung ist eine der häufigsten Ursachen für akutes Leberversagen, dennoch fehlt eine klare Definition der sensibilisierenden Risikofaktoren. Hier wurde die Rolle des Liganden aktivierten Transkriptionsfaktors Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (Ahr) bei APAP-induzierten Leberschäden untersucht. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Ahr, der Umwelt-, Ernährungs-, mikrobielle und metabolische Signale in komplexe zelluläre Transkriptionsprogramme integriert, als Rheostat für die APAP-Toxizität wirken könnte.

METHODEN: Wildtyp- oder konditionale Ahr-Knockout-Mäuse, denen Ahr in Hepatozyten ($Alb^{\Delta/\Delta Ahr}$) oder myeloischen Zellen ($LysM^{\Delta/\Delta Ahr}$) fehlt, wurden mit dem spezifischen Ahr-Liganden 2-(1'H-Indol-3'-carbonyl)-thiazol-4-carbonsäuremethylester (ITE) oder 5,11-Dihydroindolo[3,2-b]carbazole-6-carboxaldehyde (FICZ) in Kombination mit APAP behandelt.

ERGEBNISSE: Die Ahr-Aktivierung durch ITE, die an sich nicht toxisch war, verschlimmerte die APAP-induzierte Hepatotoxizität im Vergleich zu den mit einem Vehikel behandelten Kontrollen und führte zu 80 % gegenüber 0 % Mortalität nach Verabreichung einer normalerweise subletalen APAP-Überdosis. Erstaunlich ist, dass die Ahr-Aktivierung selbst bei APAP-Dosen im therapeutischen Bereich zum hepatozellulären Tod führte. Die verschlimmerte Leberschädigung war mit einer signifikanten Neutrophileninfiltration verbunden; das Fehlen von Ahr in myeloischen Zellen schützte die $LysM^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Mäuse jedoch nicht vor einer verschlimmerten APAP-Hepatotoxizität. Im Gegensatz dazu waren $Alb^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Mäuse weitgehend vor ITE-induzierten verschlimmerten Leberschäden geschützt, was darauf hindeutet, dass die Ahr-Aktivierung in Hepatozyten, nicht aber in myeloischen Zellen, für die Verschlimmerung der Krankheit entscheidend war. Mechanistisch gesehen förderte die Ahr-Aktivierung die hepatische Anhäufung toxischer APAP-Metabolite, indem sie die Expression des APAP-metabolisierenden Enzyms Cyp1a2, ein direkt nachgeschaltetes Ziel des Ahr, hochregulierte.

SCHLUSSFOLGERUNGEN: Die Ahr-Aktivierung in Hepatozyten potenziert die APAP-induzierte Hepatotoxizität. Somit könnte die individuelle Exposition gegenüber umweltbedingten Ahr-Liganden die individuelle Anfälligkeit für hyperakutes Leberversagen erklären.

Summary

BACKGROUND & AIMS: Acetaminophen (APAP)-induced liver injury is one of the most common causes of acute liver failure, however, a clear definition of sensitizing risk factors is lacking. Here, we investigated the role of the ligand-activated transcription factor aryl hydrocarbon receptor (Ahr) in APAP-induced liver injury. We hypothesized that Ahr, which integrates environmental, dietary, microbial and metabolic signals into complex cellular transcriptional programs, might act as a rheostat for APAP-toxicity.

METHODS: Wildtype or conditional Ahr knockout mice lacking Ahr in hepatocytes ($Alb^{\Delta/\Delta Ahr}$) or myeloid cells ($LysM^{\Delta/\Delta Ahr}$) were treated with the specific Ahr ligand 2-(1'H-indole-3'-carbonyl)-thiazole-4-carboxylic acid methyl ester (ITE) or 5,11-Dihydroindolo[3,2-b]carbazole-6-carboxaldehyde (FICZ) together with APAP.

RESULTS: Ahr activation by ITE, which by itself was non-toxic, exacerbated APAP-induced hepatotoxicity compared to vehicle-treated controls, causing 80 % vs. 0 % mortality after administration of a normally sublethal APAP overdose. Of note, Ahr activation induced hepatocyte death even at APAP doses within the therapeutic range. Aggravated liver injury was associated with significant neutrophil infiltration; however, lack of Ahr in myeloid cells did not protect $LysM^{\Delta/\Delta Ahr}$ mice from exacerbated APAP hepatotoxicity. In contrast, $Alb^{\Delta/\Delta Ahr}$ mice were largely protected from ITE-induced aggravated liver damage, indicating that Ahr activation in hepatocytes, but not in myeloid cells, was instrumental for disease exacerbation. Mechanistically, Ahr activation fueled hepatic accumulation of toxic APAP metabolites by up-regulating expression of the APAP-metabolizing enzyme Cyp1a2, a direct Ahr downstream target.

CONCLUSIONS: Ahr activation in hepatocytes potentiates APAP-induced hepatotoxicity. Thus, individual exposition to environmental Ahr ligands might explain individual sensitivity to hyperacute liver failure.

1. Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Leber

Die Leber ist eines der größten inneren Organe und ein wichtiger Knotenpunkt für zahlreiche physiologische Prozesse. Sie verknüpft eine Vielzahl an lebensnotwendigen Funktionen, die metabolische, immunologische, sekretorische und exkretorische Aufgaben umfassen. Sie spielt eine Schlüsselrolle im Kohlenhydrat-, Protein- und Fettstoffwechsel und fungiert als Speicherorgan für Lipide, Glykogen, Vitamine, Eisen und Kupfer. Ebenfalls sorgt sie durch die Produktion von Galle für die Fettverdauung im Darm. Darüber hinaus ist die Leber Hauptentgiftungsorgan, wodurch die Beseitigung von körpereigenen und fremden Substanzen ermöglicht wird [1]. Die für diese Arbeit relevanten hepatischen Funktionen und Eigenschaften werden in den folgenden Abschnitten ausführlicher erläutert.

1.1.1 Anatomischer Aufbau

Als parenchymatöses Organ befindet sich die Leber im rechten Oberbauch und ihre rötlich-braune Oberfläche wird von einer festen Bindegewebskapsel umgeben, die auch als Glisson-Kapsel bezeichnet wird [2, 3]. Aufgebaut ist die Leber aus vier Lappen, die sich in zwei große Lappen, den Lobus dexter und Lobus sinister sowie zwei kleinere Lappen, den Lobus quadratus und Lobus caudatus unterteilen lassen. Zwischen dem Lobus dexter und Lobus quadratus befindet sich die Gallenblase. Die Anatomie des Organs erlaubt darüber hinaus eine Einteilung in acht Segmente, welche sich aus der Gefäßversorgung der Leber ergeben [2, 3]. Um ihre Funktionen auszuführen, ist die Leber neben dem Herz als einziges Organ in zwei Blutkreisläufe integriert. Beachtliche 1,5-2 Liter Blut pro Minute fließen durch das hepatische Gefäßsystem, welches ca. 22 % der Lebermasse ausmacht [1, 4]. Über die Leberarterie wird das Organ mit sauerstoffreichem Blut versorgt (25 %), während die Pfortader nährstoffreiches, sauerstoffarmes Blut (75 %) aus dem Darm zuführt [5]. Das Blut wird über die Vena cava inferior in den systemischen Venenkreislauf zurückgeführt [2]. Auf der Unterseite des Organs bilden die Leberarterie und Pfortader zwischen dem Lobus quadratus und Lobus caudatus die Leberpforte (Porta hepatis). Hier führen die beiden Blutgefäße in die Leber hinein, während der Gallengang austritt. Die intrahepatischen Ausläufer dieser drei Gefäße bilden das sogenannte Periportalfeld, welches die Lebersegmente unabhängig voneinander versorgt. So grenzen

sechs hexagonal angeordnete Portalfelder als funktionelle Struktureinheit einen Lobulus ab, durch dessen Zentrum eine Zentralvene verläuft (Abb. 1) [1, 3, 4].

1.1.2 Mikroanatomischer Aufbau

Der Lobulus stellt die mikroanatomische Grundeinheit der Leber dar. Er wird aus zweireihig angeordneten Parenchymzellen, den Hepatozyten gebildet. Diese weisen eine polygonale Struktur mit polarer Gliederung auf und machen den größten Teil des Lebervolumens aus [1-3, 6]. Die intrahepatischen arteriellen und Pfortader-Äste verlaufen gemeinsam in die für die Leberfunktion essentiellen, viele tausende kapillarähnlichen Lebergefäße, die Sinusoide. Hier vermischt sich das sauerstoffreiche Blut der Arterie mit dem nährstoffreichen Blut aus der portalen Zirkulation und ein geringer Blutdruck erleichtert die Aufnahme von Substanzen für die Leberzellen bevor das Blut über die Zentralvene abfließt [2, 3, 6, 7]. Die hepatischen Sinusoide sind von einer Population nicht-parenchymaler, mikrovaskulärer Leber-sinusoidaler Endothelzellen (LSECs) ausgekleidet, wodurch die Hepatozyten von der Blutbahn separiert werden und der perisinusoidale Disse-Raum entsteht, der von Blutplasma und Lymphe durchströmt wird (Abb. 1) [3]. Die Fenestrierung der LSECs und das Fehlen einer Basalmembran ermöglichen den passiven Austausch von Molekülen zwischen dem Disse-Raum und dem Blut, sowie den direkten Kontakt mit den darunterliegenden Hepatozyten [1, 7, 8]. Die Oberfläche der Hepatozyten wird zusätzlich durch Mikrovilli vergrößert, was die freie Kontaktfläche im Disse-Raum maximiert und eine Aufnahme von Substanzen aus dem Blut steigert [1, 3]. Vom perisinusoidalen Raum aus gesehen ist die gegenüberliegende Seite der Hepatozyten zum Gallepool gerichtet. Hier befinden sich zwischen benachbarten Hepatozyten undurchlässige Tight Junctions, welche die Gallekanälchen abdichten, in die von den Hepatozyten Galle sezerniert wird. Entgegengesetzt des Blutflusses zum Portalfeld fließt die Galle von der Zentralvene in das Gallengangsystem. Das Lumen des Gallengangs wird dabei von den Cholangiozyten ausgekleidet (Abb. 1) [1]. Die einzigartige hepatische Mikroumgebung bietet noch vielen weiteren Zellen eine Nische. So beherbergt die Leber im Disse-Raum die hepatischen Sternzellen (HSC), welche als dynamische Zellpopulation in einem ruhenden oder aktivierten Zustand vorkommen (Abb. 1). Des Weiteren befinden sich im hepatischen Sinusoid die Organ-residenten Kupffer-Zellen (KC), die etwa 80 % aller Makrophagen ausmachen sowie Lymphozyten, die u.a. aus der Peripherie mit dem Blutstrom durch die Sinusoide der Leber zirkulieren. Im Portalfeld

finden sich neben den Versorgungsstrukturen außerdem die Dendritischen Zellen (DZ) und Fibrozyten als Bindegewebszellen [3]. Jeder dieser Zelltypen verfügt über einzigartige Funktionen, die kooperativ und perfekt auf die anatomische Organisation abgestimmt sind und die Leberfunktion auf mehreren Ebenen regulieren und aufrechterhalten.

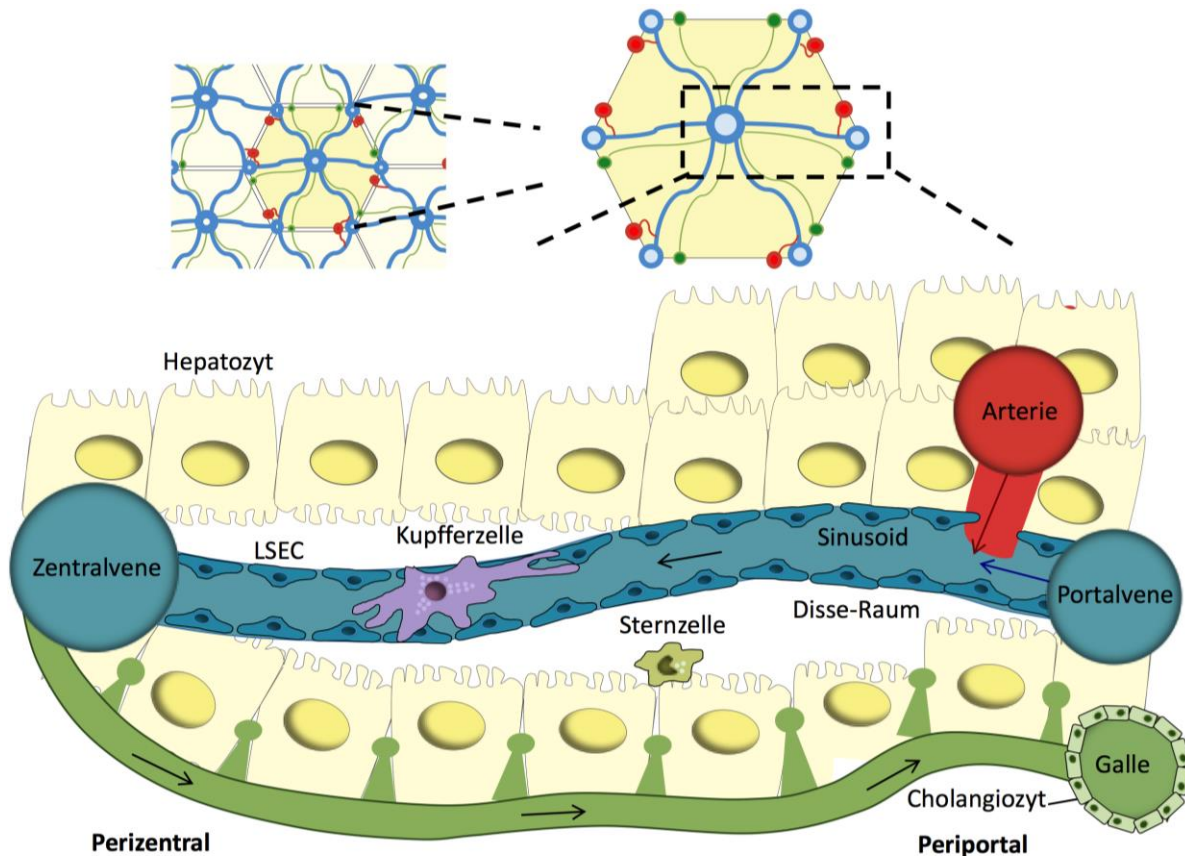


Abb. 1: Mikroanatomischer Aufbau der Leber. Die Leber ist aus sechseckigen Lobuli aufgebaut. An den Ecken der Lobuli befindet sich das Portalfeld, bestehend aus Leberarterie (rot), Pfortader (blau) und Gallengang (grün). Das Blut aus der Leberarterie und der Pfortader vermischen sich und fließen durch radiale Sinusoide in die Zentralvene ab. LSECs (blau) kleiden als gefensteretes Endothel die Sinusoide aus. Darunter befindet sich der Disse-Raum, der konzentrische Schichten von Hepatozyten abtrennt und Hepatische Sternzellen (grün) beherbergt. Für die Nährstoffaufnahme aus dem Blutplasma reichen die Mikrovilli der Hepatozyten in den Disse-Raum hinein. Kupffer-Zellen (violett) befinden sich im Sinusoid entlang der Lobulusachse. Die von den Hepatozyten abgesonderte Galle fließt entgegengesetzt von der zentralen zur portalen Zone durch die Gallenkanälchen, die in den Gallengang münden. Der Blutfluss und die sezernierten Moleküle führen zu einer räumlich abgestuften Mikroumgebung, die in drei Zonen von periportal nach perizentral unterschieden werden kann. Modifiziert nach [9].

1.1.2.1 Metabolische Zonierung der Leber

Der Blutfluss entlang des Lobulus bewirkt, dass die Zusammensetzung des Blutes, das den Lobulus verlässt, andere Eigenschaften hat als das Blut, das in den Lobulus eintritt

(Abb. 1). Während sich das Blut durch den Lobulus bewegt, nutzen die hepatischen Zellen Sauerstoff und verarbeiten Nährstoffe. Dadurch werden gleichzeitig Stoffwechselprodukte und Abfallstoffe erzeugt, die entlang des Sinusoids ausgeschieden werden. Somit entstehen Gradienten von Sauerstoff, Nährstoffen, Hormonen und Abfallstoffen, die den Leberzellen auf der Grundlage ihrer lobulären Lage präsentiert werden. Diese und andere Gradienten, die entlang der sinusoidalen „Porto-Zentralen Achse“ des Lobulus gebildet werden, führen zu einer hochvariablen funktionellen Mikroumgebung basierend auf der Lokalisation, wie z. B. ein erhöhter oxidativer Stoffwechsel in Bereichen mit höherem Blutsauerstoffgehalt. Entsprechend dieser räumlichen Variabilität sind wichtige Leberfunktionen innerhalb eines Lobulus ungleichmäßig ausgeprägt. Dieses Phänomen wird als metabolische Zonierung bezeichnet [5, 9-12]. Typischerweise wird in dem Zonierungskonzept der Lobulus in drei verschiedene Zonen unterteilt, die periportale Zone (Zone 1), die Mittellobularschicht (Zone 2) und die perizentrale Zone (Zone 3) (Abb. 1) [9, 12]. Jede Zone besitzt Hepatozyten mit unterschiedlicher metabolischer Genexpression und Funktionalität. So werden leberspezifische Markergene wie beispielweise *Cyp2e1* perizentral exprimiert, während andere Gene periportal exprimiert werden [9, 13]. Je nach Aufgabe des Hepatozyten variiert auch die Größe der Mitochondrien, der Golgi-Gehalt sowie die molekularen Strukturen, die für die Biosynthese wichtig sind [9, 14, 15]. Angesichts einer Schädigung oder eines Funktionsverlustes können beispielweise die Hepatozyten der Zone 2 die funktionellen Eigenschaften von periportalen Hepatozyten annehmen. Dies kann als Reaktion auf verschiedene leberschädigende Pathologien erfolgen [12]. Häufig weisen Leberpathologien zonierte Muster mit einer perizentralen oder periportalen Prädominanz auf, welche auf die funktionelle Zonierung der Hepatozyten zurückgeführt werden können [9, 16-20].

1.1.3 Die Darm-Leber-Achse

Die Achse zwischen Darm und Leber beschreibt das physiologische Zusammenspiel des Darms und dem zugehörigem Darmmikrobiom mit der Leber. Der Darm und die Leber kommunizieren dabei über enge bidirektionale Verbindungen durch den Gallentrakt, die Pfortader und den systemischen Kreislauf [21, 22]. Dabei interagiert die Leber mit dem Darm, indem sie u.a. Gallensäuren, Phospholipide, Cholesterin, Immunglobuline, endogene und xenobiotische Metabolite in den Gallentrakt und den systemischen

Kreislauf freisetzt. Umgekehrt beeinflussen der Darm und die darin enthaltenen Mikrobiota die Leberfunktionen über die Pfortader anhand von verstoffwechselten exogenen Substraten aus der Nahrung, der Umwelt oder Xenobiotika und über mikrobielle Produkte, Gallensäuren, Immunzellen, Antigene Komponenten und Signalmoleküle [21, 23, 24]. Eine Störung der fein austarierten Balance in diesem System kann weitreichende Folgen haben. So kristallisiert sich zunehmend heraus, dass die Darm-Leber-Achse eine Schlüsselrolle bei der Entstehung und Progression von Lebererkrankungen einnimmt. Darunter fallen Krankheiten wie die alkoholische Leberkrankheit, nichtalkoholische Fettlebererkrankung, primär biliäre und primär sklerosierende Cholangitis, Hepatitis, Leberzirrhose und das hepatozelluläre Karzinom [21, 24-26]. Von besonderer Bedeutung sind dabei die Zusammensetzung des Darmmikrobioms, die Darmbarriere, die bakterielle Translokation und der Gallenstoffwechsel. Das Darmmikrobiom setzt sich aus einer Vielzahl von Mikroorganismen, wie Bakterien, Viren, Protozoen, Archaeen und Pilzen zusammen, die als Einheit eine komplexe Symbiose bilden. Diese intestinale Mikrobiota Population wird im frühen Leben durch die Geburt und das Stillen, später durch Alter, Genetik, Nahrung und Medikamenteneinnahme beeinflusst und ist dementsprechend dynamisch, sensitiv und individuell [22, 26]. Eine Verschiebung des Darmmikrobioms kann als Folge zu einer Dysbiose und einer geschädigten Darmwand führen. In diesem Fall kommt es zu einer Translokation von mikrobiellen oder pathogenen Produkten in den portalen und systemischen Blutkreislauf. Dort angelangt, können sie das Immunsystem der Leber aktivieren und Entzündungskaskaden auslösen [21, 25, 26]. Umgekehrt beeinflussen die in der Leber produzierten Gallensäuren über den enterohepatischen Kreislauf ihrerseits die Zusammensetzung und Diversität der Darmmikrobiota, was wiederum zur Funktionsbeeinträchtigung der Darmbarriere führen kann [21, 24]. Ebenfalls hat das Darmmikrobiom einen Einfluss auf die Metabolisierung und Biotransformation von Xenobiotika [20, 27-29]. Bis heute ist allerdings noch unklar, welche spezifische Zusammensetzung des Darmmikrobioms für einen Organismus am förderlichsten ist und auch sind die Wechselwirkungen der Darm-Leber-Achse weiterhin nicht vollständig verstanden.

1.1.4 Die Leber als Immunorgan

Neben ihrer zentralen Rolle als Stoffwechselorgan ist die Leber auch für die lokale und systemische Immunhomöostase zuständig. Dies ist von entscheidender Bedeutung, da die

Leber dauerhaft mit einer Vielzahl immunogener Substanzen wie Antigenen und Metaboliten aus der Nahrung oder mikrobiellen Bestandteilen der intestinalen Mikrobiota konfrontiert wird [6, 7, 25]. Um als Immunwächter den Schutz des Organismus zu gewährleisten, muss die Leber jederzeit zwischen Immunreaktion und Toleranz balancieren [6, 7, 30]. Unter physiologischen Bedingungen hat die Leber überwiegend tolerogene Eigenschaften, diese sind jedoch auch mit einer erhöhten Permissivität für Entzündungen, Infektionen und Tumoren verbunden [7, 31]. Die komplexe Immunregulation der Leber wird anhand ihrer Mikroumgebung (1.1.2), inklusive ihrer hochspezialisierten antigenpräsentierenden Eigenschaften sowie ihrer zellulären Interaktionen bestimmt. Insbesondere die nicht-parenchymalen Zellen (NPCs) der Leber, darunter KCs oder LSECs fungieren als tolerogene Scavenger- und Antigenpräsentierende Zellen (APCs), die sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunantwort regulieren. APCs exprimieren Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (major histocompatibility complex; MHC) der Klasse I und II sowie verschiedene co-stimulatorische Moleküle [6, 7, 30, 32]. Auch parenchymale Leberzellen wie Hepatozyten tragen beachtlich zur hepatischen angeborenen Immunregulation bei, indem sie Chemokine, Zytokine, Komplementkomponenten und Akute-Phase-Proteine sezernieren. Darüber hinaus können Hepatozyten ebenfalls als APCs agieren und sich an der Initiierung der adaptiven Immunantwort beteiligen. Die Immunhomöostase kann durch verschiedene extrinsische Faktoren wie Umweltgifte, Medikamente, Ernährung, Infektionen oder Veränderungen des Darmmikrobioms gestört werden [7, 30, 33]. Häufig werden dabei Entzündungsreaktionen durch Toll-like-Rezeptor (TLR)-Signalisierung oder Inflammasom-Aktivierung initiiert, die zu einer raschen Chemokin-vermittelten hepatischen Infiltration und Aktivierung zirkulierender Leukozyten führen, darunter Neutrophile, Thrombozyten, Lymphozyten und entzündliche Monozyten [6, 25]. Bei anhaltender Leberschädigung hat die daraus resultierende chronische Leberentzündung oft verheerende und klinisch relevante Folgen.

1.2 Acetaminophen-induzierte Leberschädigung

1.2.1 Epidemiologie

Acetaminophen (APAP), auch bekannt als Paracetamol, ist seit 1955 eines der weltweit am häufigsten verwendeten Analgetika und Antipyretika [34-36]. Dementsprechend ist es auch als unentbehrliches Arzneimittel von der Weltgesundheitsorganisation gelistet

[37]. APAP ist als rezeptfreies Medikament leicht zugänglich und vor allem schnell verfügbar. Eine Überdosierung kann versehentlich, häufig jedoch auch absichtlich erfolgen. In den USA ist die APAP-Toxizität die häufigste Ursache für Arzneimittel-induzierte Leberschäden und akutes Leberversagen, welches für mehr als 20 % der dortigen Lebertransplantationen verantwortlich ist [35, 36, 38, 39]. APAP wird von über 60 Millionen Amerikanern wöchentlich eingenommen, dabei ist die Hälfte der APAP-Intoxikation auf eine unbeabsichtigte Überdosierung durch den Patienten zurückzuführen, der z.B. aufgrund von chronischen Schmerzen eine höhere Dosis als die empfohlene Tagesdosis oder Kombipräparate eingenommen hat [40-42]. Laut der Datenbank des Europäischen Lebertransplantationsregisters ist das APAP-induzierte Leberversagen auch in Europa keine Seltenheit. So war APAP in Großbritannien für 65 % und in Deutschland für 9,2 % der Fälle die Ursache von akutem Leberversagen [43-45]. Die Einnahme von bis zu 4000 mg APAP innerhalb von 24 Stunden wird als maximale Tagesdosis u.a. von der US-amerikanischen Lebens und Arzneimittelbehörde (U.S. Food and Drug Administration) als sicher eingestuft [42, 46]. APAP ist ein intrinsisches Hepatotoxin mit einem engen therapeutischen Fenster, eine gründliche Anamnese und eine frühzeitige Erkennung einer APAP-Intoxikation sind daher für die Behandlung entscheidend [41, 47]. Die Leberschädigung infolge einer APAP-Intoxikation wird als hyperakut kategorisiert und beginnt innerhalb von 8-12 Stunden nach der Einnahme, was zu einem extremen Anstieg der Serumtransaminasen Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT) mit bis zu 10.000 U/L führt [41, 45, 48, 49]. Je nach Schweregrad der Leberschädigung können Patienten eine Reihe von Symptomen aufweisen, einschließlich Gelbsucht, Verwirrtheit, Aszites, Übelkeit und Erbrechen bis hin zu offenen Anzeichen eines Leberversagens. Die verheerendste klinische Diagnose ist das akute Leberversagen, welches zu einer hepatischen Enzephalopathie, Gelbsucht und Koagulopathien führt und einen medizinischen Notfall darstellt, bei dem eine fulminante funktionelle Leberinsuffizienz zu einer raschen klinischen Verschlechterung und einer hohen Sterblichkeitsrate mit Multiorganversagen führt [39, 41, 50, 51]. Um Leberschäden zu verhindern, wird N-Acetylcystein (NAC) als primäre Behandlungsoption bei einer APAP-Hepatotoxizität eingesetzt. Es wirkt durch die Steigerung der antioxidativen Kapazität der Leber und hat damit einen multifaktoriellen Nutzen. NAC fungiert als Vorstufe von Glutathion (GSH), fördert den intrazellulären Abbau von toxischen Verbindungen und ist ein Radikalfänger [35, 45].

1.2.2 APAP-Hepatotoxizität

Der Arzneimittelmetabolismus der Leber umfasst hauptsächlich die Phase-I, welche Reaktionen der Bioaktivierung und Toxifizierung beinhaltet sowie die Phase-II, in der Entgiftungsreaktionen stattfinden [52, 53]. Bei einer therapeutischen Dosis wird APAP zu 80-90 % durch konjugierende Phase-II-Enzyme katalysiert, wie UDP-Glucuronosyltransferase (GLUC) und Sulfotransferase (SULT), wobei APAP in nicht toxische glucuronidierte und sulfatierte Metabolite umgewandelt und mit dem Urin aus dem Körper ausgeschieden wird [36, 54-56]. Eine kleine Menge APAP (2 %) wird unverstoffwechselt direkt über den Urin ausgeschieden [56]. Weitere 5-9 % APAP werden durch die Phase-I-Reaktionen der Cytochrom P450 (Cyp)-vermittelten Oxidation metabolisiert [16, 35]. Die Cyp450-Enzyme werden im glatten endoplasmatischen Retikulum (ER) und in den Mitochondrien exprimiert und sind vor allem in Hepatozyten und Dünndarmepithelien vorhanden [53, 57]. APAP wird hauptsächlich durch die Isoform Cyp2e1 und in geringerem Maße auch durch Cyp1a2 und Cyp3a4 oxidiert, wodurch ein hochreaktiver toxischer Metabolit, N-Acetyl-para-benzo-chinon-imin (NAPQI), gebildet wird [58-62]. Das toxische NAPQI hat eine kurze Halbwertszeit und wird durch die Konjugation mit intrahepatischem GSH umgehend transformiert und anschließend als ungiftige NAC (N-Acetylcystein)- oder Cystein (CYS)-Konjugate über die Galle oder den Urin ausgeschieden [16, 55, 63, 64]. Bei einer APAP-Überdosis sind die Entgiftungskapazitäten der Phase-II über Sulfatierung und Glucuronidierung überlastet und es erfolgt eine übermäßige Bildung von NAPQI durch Cyp2e1 in Phase-I. Dies führt zu einer vermehrten Reaktion von NAPQI mit den hepatischen GSH-Speichern und verursacht eine vollständige Depletion von GSH innerhalb der Leber. Freies reaktives NAPQI wird dementsprechend nicht mehr eliminiert und bindet kovalent an intrazelluläre Proteine, wodurch APAP-Proteinaddukte gebildet werden [56, 61]. Die Bildung reaktiver Metabolite führt zu oxidativen Stressreaktionen, Dysfunktionen der Mitochondrien, DNA-Schäden und schließlich zum hepatozellulären Tod, was eine Immunantwort auslösen kann und zur Leberschädigung beiträgt [52, 54, 59]. Obwohl Cyp2e1 als Schlüsselenzym bei der Bildung von toxischen APAP-Metaboliten gilt, scheint auch Cyp1a2 von essentieller Bedeutung zu sein, da in Mäusen nur ein Cyp2e1 und Cyp1a2 Doppel-Knockout (KO) vollständig vor APAP-induzierten Leberschäden schützt [65]. Die APAP-Hepatotoxizität wird dabei in der perizentralen Region der Leberläppchen verursacht, da auch NAPQI in der perizentralen, Cyp-positiven Region (Cyp2e1/Cyp1a2) gebildet wird [17, 19, 66]. Auch APAP-GSH-Addukte und die GSH-Depletion treten

bevorzugt in der Cyp2e1-positiven perizentralen Region auf [55, 67], während andere nicht toxische Konjugationsprodukte wie APAP-SUL und APAP-GLC kein zoniertes Muster aufweisen [66]. Der APAP-Metabolismus und die durch eine Überdosierung induzierte Toxizität sind in der nachfolgenden Abb. 2 veranschaulicht.

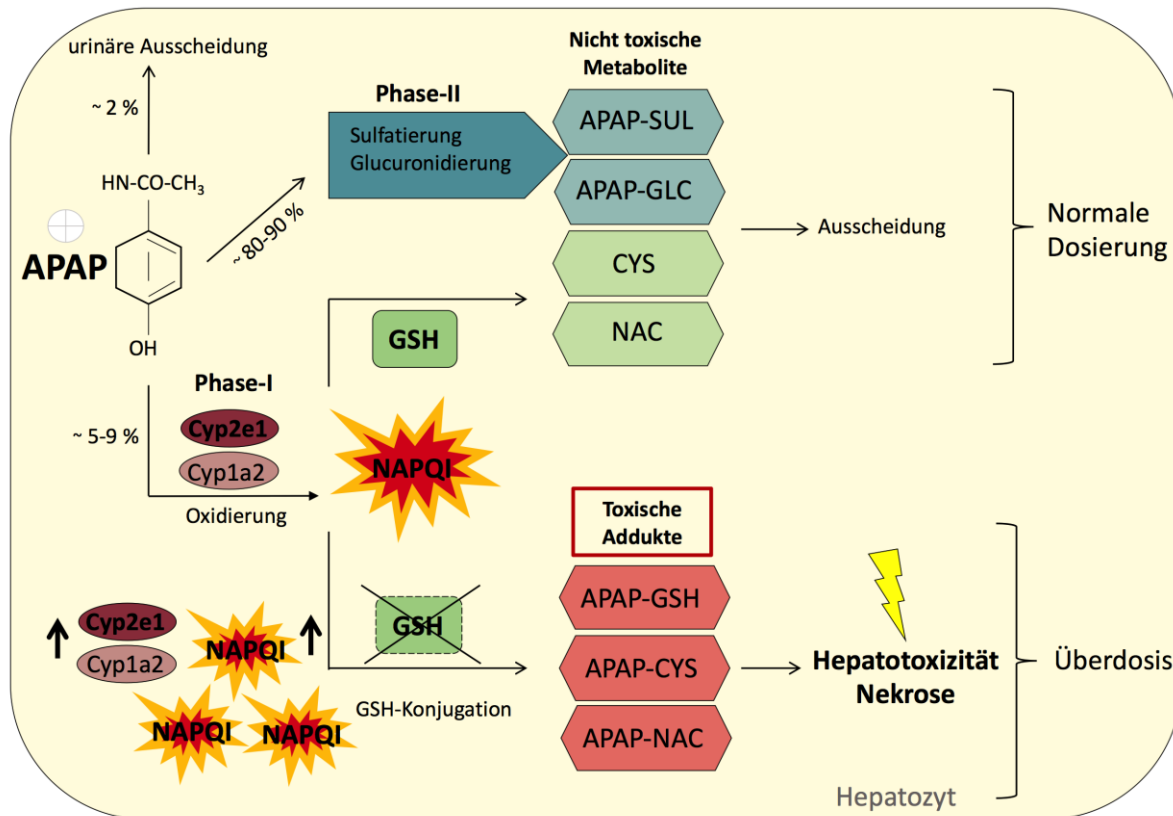


Abb. 2: APAP-Metabolismus und -Toxizität. N-Acetyl-p-Aminophenol (APAP) wird hauptsächlich durch konjugierende Phase-II-Enzyme katalysiert und ausgeschieden. Zu einem geringen Anteil wird APAP in der Phase-I durch Cytochrom P450-Isoformen (hauptsächlich Cyp2e1) in den toxischen Metaboliten N-Acetyl-p-Benzochinonimin (NAPQI) umgewandelt. Geringe Mengen von NAPQI können durch Glutathion (GSH) vollständig in inaktive Formen reduziert werden. Bei einer APAP-Überdosierung sind die Wege der Phase-II überlastet und es kommt zur vermehrten Bildung von NAPQI über die Phase-I. Gefolgt von einer GSH-Depletion, wird NAPQI nicht mehr reduziert und bildet toxische NAPQI-Proteinaddukte. Es kommt zur Nekrose von Hepatozyten, die entweder durch direkten oxidativen Stress und mitochondriale Dysfunktion oder durch die Proteinaddukte ausgelöst wird.

1.2.3 Apoptose und Nekrose

Eine Hepatotoxizität führt zum Tod der Leberzellen und kann abhängig von den aktivierten Signalwegen apoptotisch oder nekrotisch sein. In Hepatozyten kann eine direkte Toxizität und intrazellulärer Organellenstress (ER-Stress oder mitochondriale Toxizität) über die mitochondriale äußere Membranpermeabilisierung entweder

Apoptose aktivieren oder durch den sogenannten mitochondrialen Permeabilitätsübergang (MPT) zur Nekrose führen. Bei umfangreichen Leberschäden kann es schwierig sein, die vorherrschende Form des Zelltods zu unterscheiden [68]. Bei der Apoptose handelt es sich um einen ATP-abhängigen programmierten Zelltod, der morphologisch durch Schrumpfung der Zelle, Kondensation des Chromatins und weitreichende Verformung der extrazellulären Membran und Kernfragmentierung gekennzeichnet ist, jedoch ohne Freisetzung des Zellinhalts in das extrazelluläre Medium [69-71]. Durch die Phagozytose von Zellkörpern ist die Entzündung bei dieser Art des Zelltods minimiert [68-70]. Die Apoptose kann über den intrinsischen (mitochondrial) oder den extrinsischen (Todes-Rezeptor, Mustererkennungsrezeptor (PRR)-initiiert) Weg erfolgen. In beiden Fällen kommt es zur Aktivierung der proteolytischen Caspasen, welche für den kontrollierten Abbau von Zellen verantwortlich sind [64, 69-71]. Die Aktivierung einer Initiator-Caspase (Caspase 8/9) leitet eine apoptotische Signalkaskade ein und führt schließlich zu der Aktivierung einer Effektor-Caspase, wie beispielsweise der Caspase-3 [64, 68, 70]. Dabei wird die Caspase-3 an einem Aspartatrest gespalten, wobei eine p12- und eine p17-Untereinheit entstehen, die das aktive Caspase-3-Enzym bilden. Die aktive Caspase-3 degradiert mehrere zelluläre Proteine und ist für morphologische Veränderungen und DNA-Fragmentierung in Zellen während der Apoptose verantwortlich [72, 73]. Beim nekrotischen Zelltod hingegen kommt es zum Anschwellen des ER und der Mitochondrien, zur vollständigen Auflösung der Kernfragmente, zur Ruptur der Zellmembran und folglich auch zur Freisetzung intrazellulärer Komponenten [61, 70, 74-76]. Dementsprechend wird die Nekrose häufig von einer Entzündungsreaktion begleitet, beispielsweise ausgelöst durch freigesetzte Schäden-assoziierte molekulare Strukturen (DAMPs) [69, 76, 77]. Die Art und Weise des Zelltods nach APAP-induzierter Leberschädigung ist umstritten, da eine Reihe von mechanistischen Schritten der Apoptose ähneln [64, 78, 79]. Hochpotente Caspase-Inhibitoren haben allerdings keinen Einfluss auf die APAP-Toxizität [78, 80, 81]. Darüber hinaus weist der APAP-induzierte Zelltod alle Merkmale der Nekrose sowohl *in vitro* als auch *in vivo* auf [80, 82-84]. APAP-Hepatotoxizität wird demnach mittlerweile hauptsächlich mit dem Signalweg der Nekrose in Verbindung gebracht [36, 70].

1.2.4 Immunmechanismen

Studien zur Pathogenese des APAP-induzierten Leberversagens (ALI) zeigten, dass auch Entzündungsreaktionen des Immunsystems den Schweregrad und den Ausgang der Erkrankung entscheidend bestimmen [85]. Die nekrotischen Hepatozyten setzen verschiedene DAMPs frei, insbesondere das „High-Mobility Group-Box Protein 1“ (HMGB1), das Hitzeschockprotein 70 und DNA-Fragmente [25, 86, 87]. Essentiell für die Erzeugung der Entzündungsreaktion ist dabei auch die Bildung des Inflammasoms, ein zytosolischer Multiproteinkomplex, an dem PRRs beteiligt sind, wie NLRP3 in Makrophagen, welcher intrazellulär Gefahrensignale wie ATP von nekrotischen Hepatozyten detektiert [88-90]. Nach dem Erkennen der DAMPs via TLRs (z.B. HMGB1 von TLR4) werden u.a. proinflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL) 1 β und IL-18 induziert und durch Caspase-Spaltung im Inflammasom der KCs über z.B. NLRP3 aktiviert. Aktivierte KCs sezernieren ohne die Aktivierung von Caspase ebenfalls IL-6 sowie den Tumornekrosefaktor TNF- α , wobei TNF- α die Hepatozyten für Apoptose sensibilisiert [91, 92]. KCs initiieren nicht nur die immunvermittelte Schädigung, sie haben auch eine schützende Funktion über die Expression von anti-inflammatorischem IL-10 und spielen eine wichtige Rolle bei der Beseitigung von apoptotischen Zellen [25, 87, 93]. Aktivierte KCs rekrutieren darüber hinaus über Chemokine weitere Immunzellen aus der Peripherie in die Leber, beispielweise inflammatorische Monozyten (LY6C^{high}) über CCL2 [94-97]. Während die KC-Population im frühen Verlauf der APAP-induzierten Leberschädigung wahrscheinlich durch einen erhöhten metabolischen und oxidativen Stress dezimiert wird, werden diese durch infiltrierende Monozyten ersetzt [25, 87, 94, 98-100]. Infiltrierende Monozyten weisen mit der Expression von TNF- α , IFN- γ , IL-1 β und IL-6 ein pro-inflammatorisches Profil auf [99, 101, 102]. Neben diesem Profil zeigen die infiltrierenden Monozyten und die wahrscheinlich aus dieser Population ausdifferenzierten, infiltrierenden Monozyten-abgeleiteten Makrophagen (MoMF) aber ebenfalls einen regenerativen Phänotyp, indem sie die Angiogenese vermitteln [103] und die Rekrutierung und Aktivierung von Neutrophilen hemmen sowie IL-10 exprimieren [95, 99, 102, 104, 105]. Die beschriebenen Funktionen von Makrophagen bei akutem Leberversagen sind aber nach wie vor kontrovers und könnten auf ihre Heterogenität zurückzuführen sein, wobei noch nicht klar identifizierte Subpopulationen entweder die Entzündung verstärken oder ihr entgegenwirken. Im Falle von Leberschäden erfüllen Makrophagen oft mehrere essentielle Funktionen wie Zytokin- und Chemokinsekretion, Leukozytenadhäsion, Phagozytose, zelluläre Interaktion, Kontrolle der Angiogenese und

Umbau der extrazellulären Matrix [101]. Demzufolge führte eine Depletion der KCs auch zu einer massiven Verschlimmerung der Leberschädigung nach APAP im Mausmodell [85]. Daneben sind hepatische DCs ebenfalls wichtige APCs, die mit angeborenen und adaptiven Immunantworten verbunden sind [106]. Ihre spezifische Rolle in der APAP-Pathogenese ist allerdings noch unklar, da verschiedene Zelltypen in der Leber "DC-Marker" exprimieren können und zudem die verschiedenen DC-Populationen im Zusammenhang mit AILI noch nicht weiter eruiert worden sind. Hingegen ist die Rekrutierung von Neutrophilen ein charakteristisches und bekanntes Merkmal bei der APAP-induzierten Leberschädigung [107]. Neben dem durch KCs produzierten Chemokin-Gradienten (CXCL1, CXCL2, CXCL8), vermittelt auch die Freisetzung von HMGB1 die Rekrutierung von Neutrophilen und verstärkt dadurch die Gewebeschädigung [108]. In einem Mausmodell der akuten Leberentzündung reduzierte die Defizienz von Neutrophilen den Leberschaden erheblich, was ihre kritische Rolle bei dieser Art von Leberschädigung unterstreicht [25, 109]. Auch unterschiedliche Lymphozyten Populationen sind an der APAP-induzierten Entzündungsreaktion beteiligt, wobei im Einzelnen ihre Rolle noch nicht ganz klar ist. Als Zellen des angeborenen Immunsystems produzieren NK-Zellen nach ihrer Aktivierung eine Vielzahl an immunregulatorischen Zytokinen wie IFN- γ , TNF- α und IL-10. Prinzipiell tragen lymphoide Zellen zur APAP-induzierten Leberschädigung bei, indem sie IFN- γ produzieren und über das Fas/FasL-System die GSH-Speicher in Hepatozyten dezimieren [110, 111]. Die genaue Beteiligung der T-Zell-Subpopulationen wurde *in vivo* noch nicht ausreichend validiert. Es gibt Hinweise, dass die natürlichen Killer T-Zellen (NKT) an AILI beteiligt sein könnten, entweder indem sie die Cytochrom-P450-Expression wie Cyp2e1 verändern oder indem sie IL-4 und IFN- γ sezernieren und dadurch das Entzündungsmilieu in nekrotischen Bereichen verändern [112, 113]. Die $\gamma\delta$ -T-Zellen, eine unkonventionelle T-Zell Untergruppe mit T-Zell-Rezeptor aus einer γ - und einer δ -Kette, können als Subtypen entweder IFN- γ oder IL-17 exprimieren, was die Infiltration von Neutrophilen begünstigt. Es konnte gezeigt werden, dass aktivierte Makrophagen IL-23 sezernieren, was die IL-17 $\gamma\delta$ T-Zell-Subpopulation stimuliert und zu einer Anhäufung von Neutrophilen in Nekrose Bereichen und einer verstärkten Entzündung führte. Eine Depletion von $\gamma\delta$ -T-Zellen reduzierte signifikant die IL-17-Produktion nach einer APAP-induzierten Leberschädigung, was zu einer reduzierten Neutrophilen-Infiltration und Leberschädigung führte und eine funktionelle Beteiligung von $\gamma\delta$ -T-Zellen bei der Förderung der Leberentzündung zeigt [25, 114]. An der Immunreaktion bei einer APAP-

induzierten Leberschädigung sind also mehrere nicht-parenchymale Zelltypen, insbesondere KCs und infiltrierende Monozyten sowie Neutrophile und verschiedene lymphoide Immunzellen, sowie deren Zytokine und Chemokine beteiligt, was als Übersicht zusammengefasst in der Abb. 3 dargestellt ist. Wenn das Ausmaß der Hepatozytenschädigung die hepatische Regenerationsfähigkeit übersteigt, kommt es zu einem Versagen der Leberfunktion.

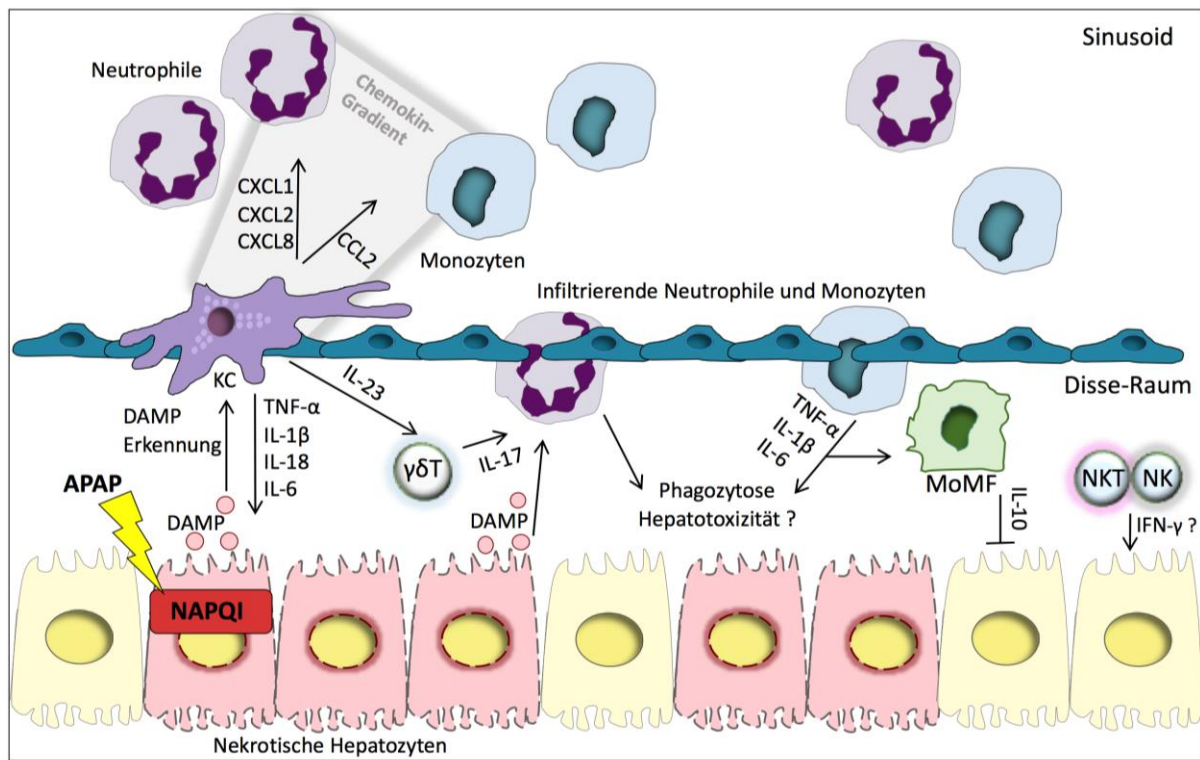


Abb. 3: Immunmechanismen der APAP-induzierten Leberschädigung. Auf zellulärer Ebene sind die Hepatozyten die ersten Zellen, die mit einer APAP-Überdosis konfrontiert werden, was zu Nekrose führt, gefolgt von der Freisetzung von DAMPs. Diese werden von den KCs erkannt, was wiederum zur Aktivierung der KCs selbst führt. Aktivierte KCs sezernieren Zytokine, die Hepatozyten für die Apoptose sensibilisieren und Chemokine, die Monozyten und Neutrophile aus der Peripherie anlockern, was ebenfalls die Entzündung fördert. Neutrophile und von Monozyten abstammende Makrophagen phagozytieren apoptotische Körper und Zelltrümmer. MoMF reifen unter dem Einfluss des entzündlichen Milieus und sezernieren anti-inflammatorische Zytokine. KC-aktivierte $\gamma\delta$ -T-Zellen sind außerdem an der Aktivierung von Neutrophilen beteiligt, wodurch die Entzündung weiter verstärkt wird. Ebenfalls könnten NK- und NKT-Zellen zur Hepatotoxizität beitragen, die Mechanismen sind noch nicht vollständig geklärt. Modifiziert nach [87]. DAMPs, damage-associated-molecular patterns; MoMF, monocyte-derived macrophages; KC, Kupfer cell; NK, natural killer cell; NKT, natural killer T cell.

1.2.5 Risikofaktoren

Obwohl unerwünschte Reaktionen auf APAP in der Regel nur bei einer Überdosis auftreten, deuten immer mehr Berichte daraufhin, dass auch therapeutische APAP-Dosen bei einigen Personen toxische Leberschäden und Leberversagen hervorrufen können [35, 40, 42, 115]. Dabei sind vermutlich individuelle Risikofaktoren von Relevanz, die für eine APAP-Toxizität sensibilisieren können. Als ein möglicher Risikofaktor gelten Wirkstoff-Wirkstoff-Interaktionen, die über den Cyp450-Metabolismus für eine APAP-Toxizität prädisponieren können. Beispielsweise wurde über die hepatotoxische Tendenz von Medikamenten, darunter Opioide, Medikamente gegen Tuberkulose [35, 45, 116, 117] und Antiepileptika sowie Heilkräuter und Nahrungsergänzungsmittel wie Johanniskraut und Knoblauch berichtet, die das Cyp450 System mechanistisch verstärken [116, 118]. Andererseits zeigten einige natürliche Produkte und Heilmittel nachweislich ein schützendes Potenzial gegen die APAP-Hepatotoxizität [56]. Hier wird vermutet, dass die kompetitive Nutzung von Cyp2e1 im pflanzlichen Arzneimittelmetabolismus die Umwandlung von APAP in seine toxischen Metabolite verringert [119-121]. Auch das komplexe Zusammenwirken von APAP und Alkohol, welche beide kompetitive Substrate für den Cyp2e1-Metabolismus sind, wurde weitreichend untersucht. Ob hier eine APAP-induzierte Toxizität gefördert wird, hängt entscheidend vom Alkoholkonsum ab [56, 122-125]. Zudem erhöht eine Mangelernährung oder Fasten die APAP-Hepatotoxizität, da hierdurch verringerte GSH-Level im Körper für die Konjugation mit dem reaktiven NAPQI zur Verfügung stehen [126]. Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die APAP-Toxizität auf intestinaler Ebene durch Dysbiose, Dysfunktion der Darmbarriere und intestinale Entzündungen beeinflusst werden kann [127]. Aktuelle Studien lassen außerdem einen Zusammenhang zwischen individueller Empfindlichkeit gegenüber APAP und Veränderungen der Darmmikrobiota und deren Metaboliten vermuten [128, 129]. So konnte gezeigt werden, dass Darmmikroorganismen eng mit der Cyp450-Expression verbunden sind, denn die hepatischen Expressionslevel von *Cyp1a2* und *Cyp3a4* von keimfrei (GF) gehaltenen Mäusen waren signifikant niedriger als bei Mäusen mit Darmbesiedelung, was eine signifikante Reduktion der APAP-induzierten Toxizität bei GF-Mäusen erklären könnte [130, 131]. Zudem kann eine Veränderung der Diversität und Menge der intestinalen Mikrobiota die Pharmakokinetik, Transformation und Entgiftung von APAP beeinflussen [131-133]. Darüber hinaus sind Personen mit Dysbiose empfindlicher für APAP-induzierte Leberschäden und akutes Leberversagen [134]. Auch zeigte sich bei *Nlrp6*^{-/-} Mäusen (Modell für intestinale Dysbiose) im Vergleich zu Wildtyp-

Mäusen, dass eine Dysbiose die APAP-induzierte Leberschädigung verschlimmern kann [134, 135]. Ebenso kann eine höhere intestinale Permeabilität dazu führen, dass schädliche Substanzen vermehrt in die Leber gelangen und so die Entzündungsreaktion sowie Hepatotoxizität von APAP verschlimmert wird [134, 136]. Auch hängen Veränderungen des APAP-Metabolismus möglicherweise mit dem Alter, dem Geschlecht und genetischen Faktoren eines Individuums zusammen. Patienten über 40 Jahre haben nach einer akuten APAP-Überdosis ein höheres Risiko für Hepatotoxizität, akutes Leberversagen und Lebertransplantation bis hin zum Tod [35, 137]. Des Weiteren kann die Arzneimittelwirkung aufgrund von Geschlechtshormonen, Körpergewicht, Körperfettzusammensetzung und Verteilungsvolumen geschlechtsabhängig sein. Es wurde berichtet, dass die Aktivität bestimmter Enzyme wie Cyp1a2 bei Männern höher ist als bei Frauen [53]. Im Maus-Modell für APAP-induzierte Leberschädigung sind die Unterschiede zwischen den Geschlechtern gut etabliert, wobei männliche Mäuse für eine APAP-Hepatotoxizität sensitiver sind und in der Regel mehr hepatische Nekrosen entwickeln [138, 139]. Ebenfalls könnten verschiedene genetische Polymorphismen der Cyp-Enzyme und ihre Aktivitätsniveaus Grund dafür sein, dass APAP individuell verstoffwechselt wird [16, 35, 140, 141]. Die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber APAP scheint bei Mäusen mit leberspezifischem miRNA-122-Knockout mit einer Hochregulierung von Ahr, Cyp1a2 und Cyp2e1 zu korrelieren [142]. Bisher sind die genauen Mechanismen der genannten Risikofaktoren, jedoch nicht ausreichend aufgeklärt [137]. Eine schematische Übersicht der interindividuellen Faktoren, die eine APAP-Hepatotoxizität beeinflussen können, ist nachfolgend in der Abb. 4 zusammengefasst.

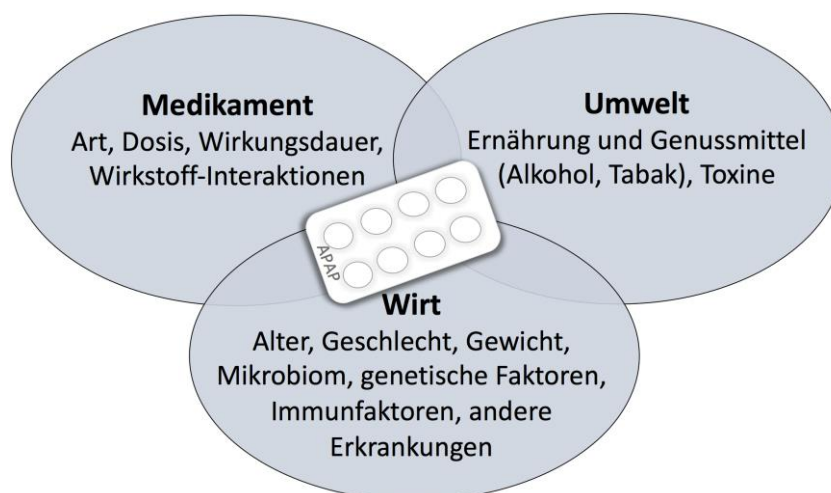


Abb. 4: Individuelle Risikofaktoren können für eine APAP-Toxizität prädisponieren. Modifiziert nach [16].

1.3 Der Transkriptionsfaktor Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (Ahr)

Ein Sensor für die Erkennung von Veränderungen des zellulären Milieus ist der evolutionär hochkonservierte, ubiquitär exprimierte, Liganden abhängige Transkriptionsfaktor Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (Ahr) [143]. Ahr wird von verschiedenen Tierklassen, darunter Säugetieren, Vögeln, Fischen und Wirbellosen exprimiert [144]. Er gilt als Sensor von Umweltgiften, Metaboliten und mikrobiellen Komponenten sowie Nahrungsbestandteilen. Dementsprechend wird Ahr in Barriereorganen wie dem Darm, der Haut und der Lunge, sowie auch vor allem in der Leber hoch exprimiert, um komplexe Transkriptionsprogramme, Liganden-, Zelltyp- und Kontextspezifisch zu steuern [7, 143, 145-147]. Ursprünglich wurde Ahr als Dioxin-Rezeptor beschrieben, der aktiviert durch die exogene Verbindung 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) über Cyp450-Enzyme toxische Effekte fördert [148, 149]. Inzwischen ist jedoch klar, dass Ahr vielfältige physiologische Funktionen hat. Neben der Regulation der Gewebemöostase, Zelldifferenzierung und Embryonalentwicklung fungiert Ahr als ein wichtiger mechanistischer Regulator im Immunsystem [7, 143, 145-147, 150, 151].

1.3.1 Die Signalwege des Ahr

Ahr gehört zur Familie der basischen Helix-Loop-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren und besteht strukturell aus einer Ligand-bindenden N-terminalen bHLH-Domäne, einer C-terminalen variablen Domäne und einer DNA-bindenden PER-ARNT-SIM (PAS)-Domäne [147, 150, 152, 153]. Über die PAS-Domäne kann Ahr sowohl endogene als auch exogene Signale wahrnehmen [154]. So steuert Ahr die Anpassung an die zelluläre Umgebung über multiple Signalwege, die im Folgenden näher erläutert werden.

1.3.1.1 Klassischer Mechanismus

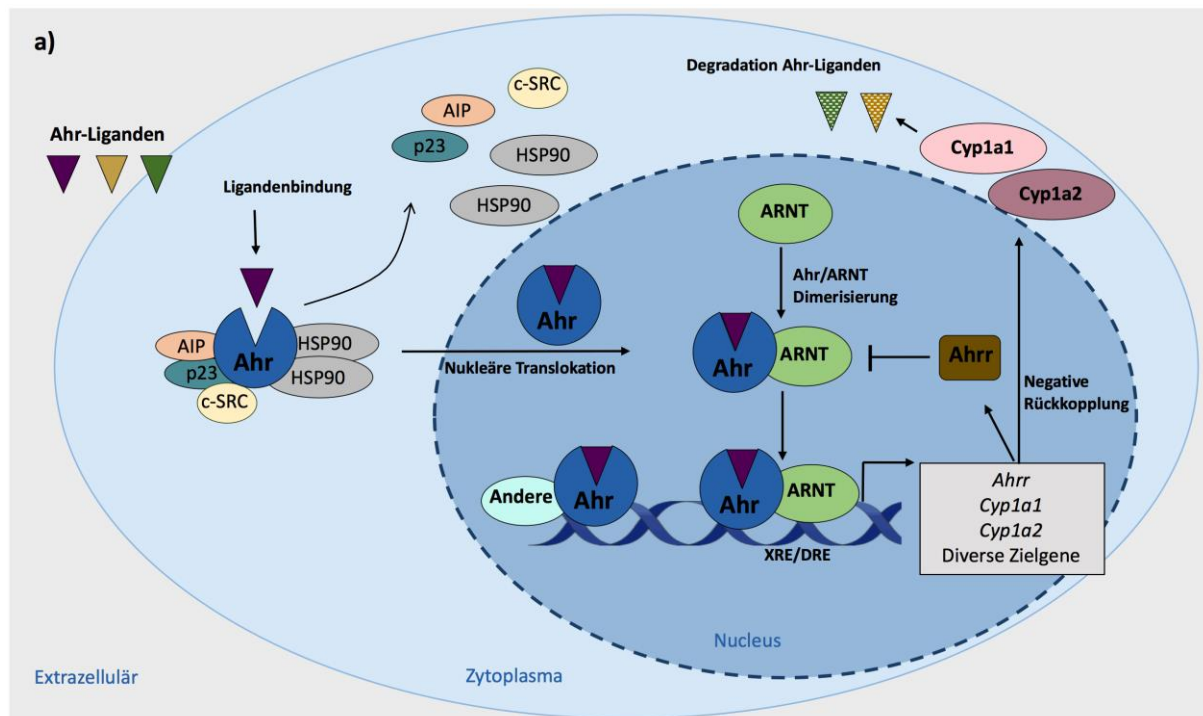
In seinem inaktiven Zustand befindet sich Ahr stabilisiert als Teil eines Proteinkomplexes im Zytoplasma. Der Proteinkomplex besteht aus einem Dimer des 90 kDa Hitzeschockproteins (HSP90), dem Ahr-interagierenden Protein (AIP), dem Co-Chaperon p23 und der Proteinkinase c-SRC. Das HSP90 bindet sowohl an die bHLH- als auch an die PAS-Domäne und verhindert damit den Abbau des Ahr und hält den Rezeptor in einer Liganden-bindenden Konformation [147, 155]. Das p23 interagiert sowohl mit Ahr als auch mit HSP90 und hemmt die Kerntranslokation sowie die Interaktion mit dem „Ahr-nuclear-translocator“ (ARNT) [147, 156]. Zudem verhindern AIP und p23 die

Ubiquitylierung und die Degradation von Ahr [147, 157, 158]. Infolge einer Ligandenbindung kommt es zu Konformationsänderungen von Ahr, die zur Dissoziation des Proteinkomplexes und zur Translokation in den Zellkern führen. Im Zellkern bildet Ahr zusammen mit seinem Bindungspartner ARNT ein Heterodimer, das hochaffine DNA-bindende Kapazitäten besitzt. Der Liganden-gebundene Ahr-ARNT Komplex wird an die XREs (Xenobiotisches Reaktionselement; Dioxin-Reaktionselement (DRE)) rekrutiert, die ein gemeinsames DNA-Konsensmotiv aufweisen (5'TNGCGTG3') und induziert die Transkription verschiedener Ahr-Zielgene [143, 147, 159, 160]. Die Nukleotidsequenz XRE findet sich z.B. in den Promotorregionen von Ahr-induzierbaren Genen wie die Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen Cyp1a1, Cyp1b1 und Cyp1a2 [161-166]. Der klassische Signalweg der Ahr-vermittelten Transkriptionsaktivität ist also durch die Transkription von Enzymen gekennzeichnet, die den Abbau von Xenobiotika und Dioxinen bewirken. In einer negativen Rückkopplungsschleife wird eine Ahr-Aktivierung begrenzt und damit auch die Ahr-gesteuerte Genexpression. So wird der Abbau von Ahr-Liganden durch Cyp1a1 und Cyp1a2 bewirkt, welche direkt von Ahr aktiviert werden [151]. Zudem konkurriert der Ahr-Repressor (Ahrr), ein direktes nachgeschaltetes Ziel von Ahr, mit dem Ahr-Ligandenkomplex um seine Interaktion mit ARNT, wodurch die Verfügbarkeit von ARNT für die Ahr-Ligandenbindung eingeschränkt wird und folglich auch die Ahr-Signalweitergabe [143, 151, 167]. In ähnlicher Weise hat sich gezeigt, dass der Hypoxie-induzierbare Faktor 1 α (HIF1 α) ebenfalls mit Ahr um die Interaktion mit ARNT konkurriert [168].

1.3.1.2 Alternative Mechanismen

Über alternative Mechanismen steuert Ahr auch die Expression von Genen, die keine XREs in ihren regulatorischen Regionen aufweisen. So kann Ahr im Komplex mit anderen Transkriptionsfaktoren auch an andere Zielsequenzen rekrutiert werden. Der Ahr-ARNT-Ligandenkomplex interagiert z.B. mit dem Östrogenrezeptor (ESR), was zur Rekrutierung des Ahr-ARNT-ESR-Komplexes an Östrogen-Reaktions-DNA-Elemente führt [169]. Ebenfalls wurde über ähnliche Wechselwirkungen von Ahr mit dem Retinsäure-Rezeptor und dem Retinoblastom-Protein über eine Interaktion mit dem Krüppellike-Faktor 6 berichtet [170-173]. Auch kann Ahr direkt durch die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor p65 (Rel) A und B und indirekt über Suppressor der Zytokinsignalisierung 2 (SOCS2)-abhängige Mechanismen den Nuklearfaktor κ B (NF κ B)

und seine abhängigen Transkriptionsprogramme steuern [150, 174-177]. In ähnlicher Weise reguliert Ahr die Aktivierung von STAT-Proteinen („Signal Transducer and Activator of Transcription“), die bei der Regulierung von Immunreaktionen eine zentrale Rolle spielen [178-180]. Auch kann Ahr epigenetische Mechanismen steuern, die durch lange nichtkodierende RNAs und mikroRNAs (miRNA) kontrolliert werden [143]. Kürzlich wurde ein zusätzlicher Mechanismus zur Aktivierung von Ahr entdeckt, wobei die auf apoptotischen Zellen oder apoptotischen Mikropartikeln exponierte DNA in Abhängigkeit von TLR9 Ahr-aktivierend wirkt [181]. Darüber hinaus kann Ahr biologische Prozesse auch auf nicht-genomische Weise beeinflussen. Die Dissoziation des zytoplasmatischen Ahr-Komplexes bei Ligandenbindung setzt mehrere biologisch aktive Moleküle wie die c-SRC-Proteinkinase frei, was zur Phosphorylierung mehrerer Zielgene, einschließlich der Indolamin 2,3dioxygenase 1 (IDO1) führt [143, 150, 182]. Außerdem fungiert Ahr im Komplex mit dem Cullin-4B-Ubiquitin-Ligase-Komplex (CUL4B) als E3-Ubiquitin-Ligase und trägt so zum proteasomalen Abbau von Substraten wie dem ESR bei [143, 150, 183]. Die Abb. 5 gibt einen schematischen Überblick über die klassischen und alternativen Ahr-Signalwege.



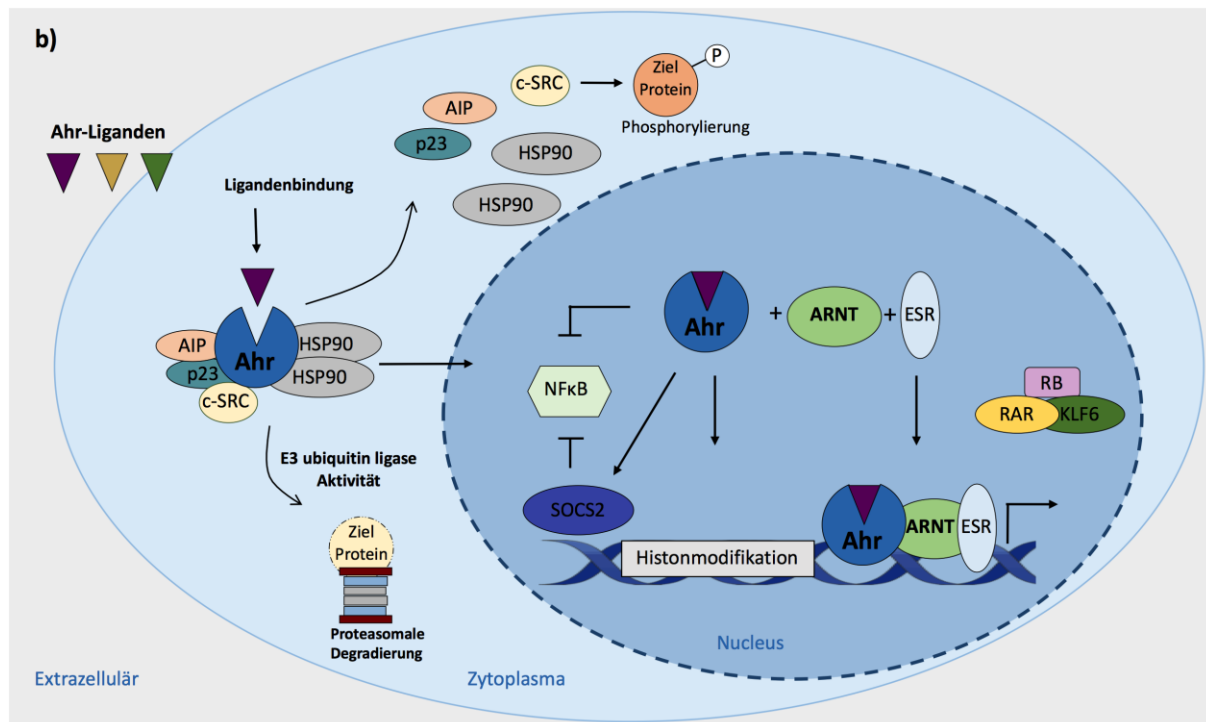


Abb. 5: Ahr-Signalwege. **a)** Inaktiver Ahr befindet sich als Komplex im Zytoplasma mit dem Chaperon HSP90, dem Co-Chaperon p23, AIP und c-SRC. Die Ligandenbindung führt zu Konformationsänderungen, zur Dissoziation des Proteinkomplexes und zur Translokation von Ahr in den Zellkern. Im Zellkern bildet Ahr ein Heterodimer mit ARNT. Ahr/ARNT bindet an bestimmte regulatorische Elemente (XRE/DRE) und induziert so die Transkription verschiedener Zielgene. Zusätzlich kann Ahr im Komplex mit anderen Transkriptionsfaktoren mit alternativen Bindungsstellen interagieren. Die Aktivierung von Ahr wird in einer negativen Rückkopplungsschleife durch den Ahr-Repressor Ahrr, der die Bildung von Ahr/ARNT-Dimeren hemmt, und durch die Ahr-induzierten Enzyme Cyp1a1 und Cyp1a2, die Ahr-Liganden abbauen, begrenzt. **b)** Neben seiner Transkriptionsaktivität fungiert Ahr auch als Teil des E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes, der den proteasomalen Abbau von Zielproteinen steuert. Die Ahr-Aktivierung löst außerdem Phosphorylierungskaskaden aus, die von c-SRC nach dessen Freisetzung aus dem Ahr-Chaperonkomplex gesteuert werden. Ahr kann mit weiteren Transkriptionsfaktoren wie ESR oder KLF6 interagieren und ebenfalls auf direkte und indirekte Weise mit der entzündungsfördernden NFκB-Signalgebung interagieren. Modifiziert nach [184]. Ahr, Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor; ARNT, Ahr-nuclear-translocator; HSP90, Hitzeschock Protein; AIP, Ahr-interagierendes Protein; XRE, Xenobiotisches Reaktionselement; DRE, Dioxin-Reaktionselement, Ahrr, Ahr-Repressor; NFκB, NuklearfaktorκB; ESR, Östrogenrezeptor; RAR, Retinsäure-Rezeptor; RB, Retinoblastom-Protein; KLF6, Krüppellike-Faktor 6

1.3.2 Ahr-Liganden

Verschiedene exogene Substanzen wie das Dioxin TCDD, andere Schadstoffe und Xenobiotika wurden als hochaffine Ahr-Agonisten ausführlich beschrieben [148, 149, 162, 185]. In den letzten Jahren wurden zusätzlich zahlreiche nicht-toxische Ahr-Liganden identifiziert, die aus der Nahrung stammen oder vom Organismus selbst

endogen erzeugt werden. Es hat sich gezeigt, dass Ahr-Liganden eine wichtige Rolle bei der Regulierung der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort spielen. Als Sensor für Umweltreize kann Ahr die Signale von Toxinen, Stoffwechselprodukten aus der Nahrung oder mikrobiellen Verbindungen in die Immunantwort integrieren [145, 146, 150, 151, 186]. Das Ergebnis der Ahr-Aktivierung kann regulatorisch, entzündungsfördernd oder -hemmend ausfallen und wird von den jeweiligen Ahr-Liganden bestimmt, die sich nicht nur in ihrer Herkunft, sondern auch in ihrer Affinität und Halbwertszeit unterscheiden. Ebenfalls hängt die Ahr-Regulation entscheidend von den kontextuellen Signalen in der Zielzelle ab, da Ahr zelltypabhängige Transkriptionskomplexe mit verschiedenen anderen Molekülen bilden kann [150]. Nahrungsmittel wie Obst und Gemüse, insbesondere Blumenkohl und Brokkoli aus der Familie der *Brassicaceae* enthalten eine Reihe Ahr-modulierender Faktoren. Nach dem Verzehr entstehen durch Hydrolyse die Ahr-Agonisten Indol-3-Carbinol (I3C) und seine Derivate 3,30-Di-Indolyl-Methan (DIM), [2-(Indol-3-ylmethyl)-indol-3-yl]-Indol-3-ylmethan (LTr1) und Indolo[3,4-b]-Carbazol (ICZ) [187-189]. Besonders die Indolderivate der Aminosäure Tryptophan scheinen eine wichtige Gruppe von Ahr-Agonisten zu sein [147]. Beispielweise entsteht endogen im Tryptophan-Metabolismus durch die Enzyme Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) und Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO) der Ahr-Ligand n-Formylkynurenin (Kyn) und weitere Kyn-Metabolite [189-191]. Ebenfalls kann Tryptophan durch endogene oxidative Reaktionen zu den hochaffinen Ahr-Liganden 5,11-Dihydroindolo[3,2-b]carbazole-6-carboxaldehyde (FICZ) und 2-(10 H-Indol-30-carbonyl)-thiazol-4-carbonsäuremethylester (ITE) umgebaut werden [147, 179, 192-194]. FICZ wird hauptsächlich durch einen UV-Licht-induzierten photooxidativen Abbau von Tryptophan in der Haut gebildet [147, 195, 196]. ITE hingegen ist das Produkt einer Reaktion zwischen Tryptophan und Cystein [147, 193]. Auch spielt das Mikrobiom eine Schlüsselrolle bei der Ahr-Aktivierung, denn mikrobielle Metabolite von kommensalen Bakterien und Pilzen fungieren ebenfalls als Ahr-Liganden [143, 147]. Darüber hinaus wurde die Bioverfügbarkeit bestimmter Ahr-Liganden, wie Indolderivate von Tryptophan, mit der Zusammensetzung der Darmmikrobiota in Verbindung gebracht [151, 186].

1.3.3 Physiologische Funktionen des Ahr

1.3.3.1 Ahr als Immunmodulator

Ahr fungiert als Schlüsselmolekül im Immunsystem, indem er durch seine Aktivität eine Vielzahl von angeborenen und adaptiven Immunzellen beeinflusst, darunter T-Zellen, angeborene lymphatische Zellen (ILCs), DCs und Makrophagen [143, 145-147, 150, 151]. In T-Zellen kann Ahr sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch wirken. Während Ahr die Differenzierung von entzündlichen, IL-22-produzierenden Th17-Zellen fördert, ist er auch entscheidend an der Induktion von regulatorischen T-Zell-Populationen beteiligt [150]. Besonders relevant ist Ahr für die ILCs, denn er steuert die Differenzierung und Aufrechterhaltung der IL-22-produzierenden ILC3s, den angeborenen Gegenstücken der Th17/Th22-Zellen und ist somit ein wichtiger Regulator der Immunhomöostase im Darm [143, 197, 198]. Ebenso hat Ahr einen entscheidenden Einfluss auf die Funktion der NK-Zellen, indem er durch Liganden-abhängige Aktivierung die Antitumor-Zytotoxizität sowie die IFN γ -Produktion fördert [199]. In APCs wird Ahr mit toleranzfördernden Aktivitäten in Verbindung gebracht. So kann Ahr in DCs MHC-II und co-stimulatorische Moleküle herunter regulieren und die Unterdrückung von Th1- und Th17-polarisierenden Zytokinen bewirken. Darüber hinaus kann Ahr in DCs die Expression vonIDO und Retinsäure (RA) induzieren, zwei wichtigen Mediatoren der Treg-Differenzierung [150, 179, 200, 201]. Für Makrophagen wurde gezeigt, dass Ahr zusammen mit dem Transkriptionsfaktor c-Maf die Expression des entzündungshemmenden Zytokins IL-10 fördert [150]. Ebenso schränkt Ahr als Schlüsselvermittler der Endotoxin-Toleranz die entzündliche IL-6 und TNF- α Reaktion auf Lipopolysaccharide (LPS) in Makrophagen ein [182, 202].

1.3.3.2 Ahr in der hepatischen Homöostase und Immunantwort

Die Leber ist dauerhaft Ahr-Liganden aus dem Darm ausgesetzt und produziert selbst viele Ahr-Liganden. Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass Ahr essentielle hepatische Prozesse regulieren könnte, dennoch ist die Rolle von Ahr bei der Regulation der hepatischen Homöostase und Immunantwort erst in Ansätzen geklärt. So entwickeln Ahr-KO-Mäuse eine Leberpathologie, die durch Fibrose und Gallenwegsentzündung gekennzeichnet ist [203-205]. Auch führt eine Behandlung von Wildtyp-Mäusen mit dem Liganden TCDD zu Leberentzündung und Fibrose [206]. Allerdings ist die Rolle von Ahr bei der Leberfibrose nach wie vor umstritten, da sie sowohl durch den Verlust als auch durch die Verstärkung einer Ahr-Aktivität ausgelöst werden kann [204, 207-210]. Von

Interesse für die Ahr-abhängige hepatische Immunregulation sind tolerogene Kynurenine, die als Ahr-Liganden konstitutiv in der Leber durch das Hepatozyten-spezifische Enzym Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO2) produziert werden [211]. Eine Kynurenin-vermittelte Ahr-Aktivierung kann sowohl bei T-Zellen als auch bei APCs eine Immunsuppression auslösen [150]. Ebenso führt die Induktion des Kynurenin-produzierenden Enzyms IDO1 in HSCs als Reaktion auf eine LPS-Belastung zu verstärkten Ahr-Signalen in Tregs, die wiederum eine Hochregulierung und epigenetische Stabilisierung von Forkhead-Box-Protein P3 (Foxp3), sowie zelluläre Expansion und verstärkte Suppressionskapazität induzieren [212]. Darüber hinaus wurde die Geweberesidenz und Aufrechterhaltung hepatischer NK-Zellen mit der Ahr-Signalübertragung in Verbindung gebracht [194]. Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass Ahr auch an der Entstehung von immunvermittelten Lebererkrankungen beteiligt sein könnte. Mehrere Studien belegen eine Schutzfunktion von Ahr bei einer akuten immunvermittelten Hepatitis im Concanavalin A-Modell [213-217] oder eine Ahr-Dysfunktion bei autoimmuner Hepatitis im Patienten [218, 219]. Auch in Bezug auf die primäre biliäre Cholangitis gibt es Hinweise darauf, dass Ahr an der Dysregulation von T-Zell-Reaktionen beteiligt sein könnte. Dementsprechend könnten Ahr-aktivierende Dioxine einen Risikofaktor für die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen darstellen [220]. Zudem wurde Ahr als immunregulierender Faktor bei *Trypanosoma cruzi* induzierter Leberinfektion identifiziert, der eine wirksame Antiinfektionsimmunität erheblich beeinträchtigt [221]. Auch die Akute-Phase-Reaktion der Leber scheint von Ahr abhängig zu sein, denn Ahr reguliert über die Unterdrückung des NFκB-Signalwegs die Expression von Zytokin-induzierten Akute-Phase-Genen, und eine Nahrungsergänzung mit Ahr-Liganden führte zu einer verminderten Regulierung der Akute-Phase-Reaktion [222]. Ebenfalls zeigte sich entlang der Darm-Leber-Achse, dass Ahr-Liganden, die von der Darmmikrobiota produziert werden, über das Pfortader Blut in die Leber gelangen und dort lokal die Immunreaktionen beeinflussen können. In einer Studie mit GF-Mäusen und konventionell gehaltenen Mäusen, die mit einer fettarmen oder fettreichen Nahrung gefüttert wurden, konnten die von Tryptophan abgeleiteten Ahr-Liganden Tryptamin und Indol-3-Acetat (I3A) als wichtige Regulatoren von entzündlichen Makrophagen nach Stimulation mit LPS oder Fettsäuren identifiziert werden. Darüber hinaus schränkte I3A Ahr-abhängig auch die entzündliche Aktivierung von Hepatozyten ein [223]. Übereinstimmend hierzu können verschiedene mikrobielle, über Ahr signalisierende Tryptophan-Metabolite, sowie eine direkte Behandlung mit den Ahr-Liganden FICZ oder

I3C eine Alkohol-induzierte Leberpathologie reduzieren [224-226]. Umgekehrt zeigten Ahr-KO-Mäuse eine erhöhte Anfälligkeit für Ethanol-induzierte Leberschäden, und bei Patienten war die alkoholische Lebererkrankung mit niedrigen Spiegeln mikrobieller Tryptophan-Metabolite aus dem Darm verbunden, was die klinische Bedeutung des Ahr-Signalwegs bei alkoholischen Lebererkrankungen unterstreicht [224, 226].

1.3.4 Ahr als therapeutisches Zielmolekül

Der Transkriptionsfaktor Ahr beeinflusst die Immunität auf mehreren Ebenen und ist an einem breiten Spektrum von physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt, eine therapeutische Anwendung durch Ahr scheint daher denkbar. In mehreren Mausmodellen für Autoimmunerkrankungen, darunter experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis, Diabetes, Psoriasis und Lupus erythematodes wurden endogene nicht-toxische Ahr-Liganden bereits erfolgreich als wirksame Immunsuppressiva getestet [145, 150, 181, 227]. Die vielfältigen Ahr-Funktionen bei der Regulierung entzündlicher, fibrogener oder tumorerzeugender Prozesse in der Leber lassen Ahr ebenfalls als vielversprechendes therapeutisches Ziel bei verschiedenen Lebererkrankungen erscheinen. Es ist denkbar, dass Ahr-Liganden auch bei Autoimmunerkrankungen, die die Leber betreffen, von therapeutischem Wert sein könnten. Zur Untermauerung dieses Gedankens wurde kürzlich eine Ahr-Dysfunktion mit Autoimmunhepatitis in Verbindung gebracht [218]. Auch die Abschwächung der Akute-Phase-Reaktion durch diätetische Ahr-Liganden [222], die Verhinderung der Leberfibrose durch ITE [207] oder der Alkohol-induzierten Leberschädigung durch FICZ [224], die bisher nur bei Mäusen nachgewiesen wurde, sprechen für Ahr-Liganden als neue therapeutische Maßnahmen bei Lebererkrankungen. Umgekehrt könnte die Hemmung von Ahr bei Leberinfektionen die antiinfektiöse Immunität stärken, wie bei *Trypanosoma cruzi*-Infektionen gezeigt wurde [221]. Darüber hinaus ist die gezielte Beeinflussung des IDO1/TDO2-Kynurenin-Ahr-Stoffwechsels zur Wiederherstellung einer wirksamen Anti-Tumor-Immunantwort ein wichtiges Ziel der Krebsimmuntherapie [228, 229], was für die Therapie von Hepatozellulären Karzinomen und Cholangiokarzinomen von großer Bedeutung sein könnte.

1.4 Ziel der Studie

Obwohl APAP bei therapeutischer Dosierung relativ sicher zu sein scheint, kommt es weiterhin zu Fällen von APAP-induziertem Leberversagen und zu irreversiblen Leberschäden, die eine Lebertransplantation erforderlich machen. Dies stellt ein anhaltendes globales Problem dar. Angesichts der wachsenden Verbreitung von Kombinationspräparaten in Form von Schmerzmitteln und Antihistaminika ist APAP nach wie vor eine bedeutende Ursache für akute Hepatotoxizität und akutes Leberversagen mit einer weltweit zunehmenden Prävalenz. Für die individuelle Sensitivität gegenüber APAP und der Fälle des APAP-induzierten Leberversagens bei therapeutischer Anwendung gibt es bisher keine ausreichende Erklärung. Aufgrund der vielfältigen metabolischen Funktionen des Transkriptionsfaktors Ahr in der Leber und seiner Induktion der Cytochrome kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sowohl die Anwendung von immunsuppressiven Ahr-Agonisten als auch natürliche Ahr-Liganden, die metabolischen und toxikologischen Funktionen der Leber beeinträchtigen könnten. Vor diesem Hintergrund und der Kenntnis, dass das hepatische Cytochrom Cyp2e1 als Schlüsselenzym, aber auch weitere Enzyme wie Cyp1a2 bei der Bildung von toxischen APAP-Metaboliten fungieren, wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Ahr-Aktivierung den APAP-Metabolismus beeinflussen könnte. Der Zusammenhang zwischen individueller Empfindlichkeit gegenüber APAP und Veränderungen in der Darmmikrobiota und deren Metaboliten wurde in jüngsten Studien angedeutet [134]. In einem Individuum hängt die Menge an nicht-toxischen Ahr-Liganden von der Ernährung und der Zusammensetzung der Mikrobiota ab. Da Ahr mit verschiedenen aus der Nahrung stammenden und mikrobiellen Metaboliten interagiert und aktiviert werden kann, wurde außerdem die Hypothese aufgestellt, dass die individuelle APAP-Empfindlichkeit durch die Aktivierung von Ahr beeinflusst werden könnte. Diese Annahme wurde durch die Beobachtung unterstützt, dass die erhöhte Empfindlichkeit von Mäusen mit leberspezifischem miRNA-122-KO gegenüber APAP mit einer Hochregulierung von Ahr, Cyp1a2 und Cyp2e1 zu korrelieren scheint [142]. Gerade in Zusammenhang mit einer APAP-Pathogenese ist der Ahr mit seinen komplexen, vielfältigen Funktionen noch nicht erforscht und verstanden. In der Fachliteratur werden zwar einige Risikofaktoren für eine APAP-Prädisposition beschrieben, die funktionelle Relevanz ist aber weiterhin unklar. Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit könnten wichtige Erkenntnisse darüber geben, ob eine Wechselwirkung mit Ahr besteht und ob eine immunsuppressive Therapie mit Ahr-Liganden bei gleichzeitiger APAP-Anwendung unbedenklich ist. Um die aufgestellten

Hypothesen zu testen, wurden die folgenden aufgeführten Punkte mithilfe von serologischen Parametern, Histologie, RNA- und Protein-Analysen sowie anhand von Durchflusszytometrie konkret versucht aufzuklären.

- 1.** Untersuchung der Rolle des Ahr im akuten APAP-Modell mittels Applikation von vorteilhaft immunmodulatorisch erwiesenen Ahr-Liganden aus präklinischen Modellen von Autoimmunerkrankungen [143, 147]
- 2.** Untersuchung geschlechtsspezifischer Effekte der Ahr-Aktivierung im APAP-Modell
- 3.** Identifikation zelltypspezifischer Ahr-Effekte im APAP-Modell mittels Ahr-defizienter-Mäuse
- 4.** Untersuchung der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Ahr-Aktivierung und APAP

2. Material & Methoden

2.1 Materialien

2.1.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysewaage A200S	Satorius AG
Autoklav Systec VX-120	Systec GmbH
Blot-System mini-Trans-Blot® Cell	Bio-Rad
COBAS Mira System	Roche
Dispenser Multipette® stream	Eppendorf AG
Durchlichtmikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss
Extinktionsmessgerät (ELISA Reader) INFINITY F50	Tecan Trading AG
Flockeneisbereiter AF 103	Scotsman® Ice Systems
Fluoreszenzmikroskop BZ-900	Keyence
Fluoreszenzmikroskop BZ-X700	Keyence
Fusion FX Chemie-, Biolumineszenz und UV-Fluoreszenz System	Vilber Lourmat Deutschland GmbH
Gelelektrophorese-System mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad
Gelkämme mini-PROTEAN®	Bio-Rad
Gelplatten mini-PROTEAN® Spacer Plates 1,5 mm mit Deckplatte	Bio-Rad
Gießstand mini-PROTEAN® Casting Stand mit casting Frame	Bio-Rad
Heizblock	Techne Dri-Block
Heizblock Thermomixer C	Eppendorf AG
Kombischüttler	Edmund Bühler
Kryostat HM550	Thermo Fisher Scientific
Kugelmühle Tissue Lyser II	Quiagen
Kühlplatte Histologie (Tissue cool Plate Cop20)	Medite
LSRII, FACS Canto (Durchflusszytometer)	BD Biosciences
MACS® Multistand	Miltenyi Biotec
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Mehrkanalpipette Research® plus (10, 100, 300 µl)	Eppendorf AG
Mikrotom CUT 5062	SLEE medical
Mikrowelle	Bosch
Nanodrop™ 2000	Thermo Fisher Scientific
Neubauer Zählkammer	Optik Labor Frischknecht

Pasteurpipetten	Sarstedt AG & Co
Perfusionspumpe	Dynex Technologies
pH-Meter S20 SevenEasy™ pH	Mettler-Toledo GmbH
Pipetten (1, 10, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf AG
Pipettierhilfe Pipetboy	Integra Biosciences AG
Präzisionswaage EMB 100-3	Kern & Sohn GmbH
Rollenmischer RS-TR 5	Phoenix Instrument
Rollenmischer Stuart™ SRT6	Merck KGaA
Sicherheitswerkbank (Type DLF BSS6)	Clean Air Woerden
Spannungsquelle PowerPac™ Basic	Bio-Rad
Thermocycler	PeQstar
Tischwaage	Kern & Sohn GmbH
Tissue Cool Plate COP 20	MEDITE
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex
ViiA7 Real Time PCR System	Applied Biosystems
Vortex, GENIE 2	Carl Roth
Wärmeplatte	Präzitherm
Wasserbad	GFL
Wasserbad mit Schüttelfunktion	GFL
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG
Zentrifuge 5810R	Eppendorf AG
Zentrifuge MyFuge™ 12 mini Zentrifuge	Benchmark Scientific Inc.
Zentrifuge, Biofuge B	Heraeus Sepatech

2.1.3 Materialien

Material	Hersteller
1 ml Spritzen, Inject-F Tuberkulin	B. Braun
Amersham™ Protran® Western blotting membrane, Nitrocellulose, Porengröße 0,45 µm	GE Healthcare
Auffangefäß/Flasche 500 ml	Sarstedt AG & Co
Combitips advanced® (0,1, 0,2, 1, 5 und 10 ml)	Eppendorf AG
Cryo Gefäße	Sarstedt AG & Co
Deckgläschen	Sarstedt AG & Co
FACS-Röhrchen	Sarstedt AG & Co
Falcon Reaktionsgefäße (15, 50 ml)	Greiner Bio-one
Feuchtekammer	Simport

Filtropur BT50, 500 ml, 0,2 µm Flaschenaufsatzfilter	Sarstedt AG & Co
Histologie Einbettkassetten	Kabe Labortechnik
Kanüle 26G x ½ 0,45mm x 13mm	Becton & Dickinson
MACS® Pre-Separation Filters 30 µm	Miltenyi Biotec
MicroAmp™ Fast 96-Well Reaction Plate 0,1 ml	Applied Biosystems
Mikroreaktionsgefäße (Eppi) (0,2, 0,5, 1,5, 2, 5 ml)	Sarstedt AG & Co
MS-Säulen	Miltenyi Biotec
Objektträger SuperFrost Plus™	Fischer Scientific GmbH
Petrischale	Sarstedt AG & Co
Pipettenspitzen (20, 100, 300, 1200 µl)	Sarstedt AG & Co
Pipettenspitzen Biosphere® mit Filter (20, 100, 200, 300 und 1200 µl)	Sarstedt AG & Co
Serologische Pipetten (2, 5, 10, 25, 50 und 100 ml)	Sarstedt AG & Co
Western Blot Transfersystem	BioRad
Whatman® Gel Blot Papier	GE Healthcare
Zellsieb, 100µm	BD Falcon

2.1.4 Substanzen

Substanz	Hersteller
Aceton (reinst)	TH. Geyer
Albumin Fraction V (BSA)	Carl Roth
Anti-F4/80 MicroBeads, mouse	Miltenyi Biotec
Antifect	Schülke & Mayr GmbH
Aqua	B. Braun
Citratpuffer (unmasking solution)	Vector Laboratories
EDTA	Invitrogen
Entellan®	Merck
Eosin G-Lösung 0,5 % wässrig	Carl Roth
Ethanol absolut	Th. Geyer
Ethanol vergällt	Carl Roth
FACS Clean Solution	BD Bioscience
FACS Flow Sheath Fluid	BD Bioscience
FACS Rinse Solution	BD Bioscience
Fc-Block (CD16/32)	eBioscience
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH
Fluorescence Mounting Medium	Dako

GBSS	Sigma-Aldrich
Hämalaun nach Meyer (sauer)	Carl Roth
Hoechst 33258 Kernfarbstoff	Invitrogen
IMDM Medium	Thermo Fisher Scientific
Ketamidol® (100 mg/ml)	WDT
Kollagen R	Serva
Kollagenase	Nordmark Biochemicals
Magermilchpulver	Spinnrad GmbH
Maisöl	Sigma-Aldrich
Methanol	Carl Roth
Nuclease-free H ₂ O	Quiagen
OneComp eBeads™ Compensation Beads	Invitrogen
OptiPrep™ Density gradient Medium	Sigma-Aldrich
Pacific Orange™ Succinimidyl Ester (PacO)NHS	Invitrogen
Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
Paraformaldehyd Lösung 4 % in PBS (PFA)	Morphisto
Penicillin / Streptomycin	Gibco
Proteinase K, rekombinant	Roche
Rompun 2 %	Bayer Vital GmbH
Roti®-Free Stripping-Puffer 2.2 plus	Carl Roth
Roti®-Histofix 4 %, Formaldehydlösung	Carl Roth
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Streptavidin Microbeads	Miltenyi Biotec
SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Fisher Scientific
T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent	Thermo Fisher Scientific
Tissue Tek® O.C.T™ Compound	Satura Finetek Germany GmbH
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich
Trypanblau 0,4 %	Gibco
Tween® 20	Sigma-Aldrich
Xylol (Isomerengemisch, min. 99 %)	ChemSolute® Th. Geyer GmbH & Co. KG

2.1.4.1 Ahr-Liganden

Ligand	Hersteller
2-(1H-Indol-3-ylcarbonyl)-4-thiazolecarboxylicacidmethylester (ITE)	Tocris Bioscience

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

2.1.5 Kits

Kit	Hersteller
DAB-HRP System	Dako
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
In situ Cell Death Detection Kit, TMR Red	Roche
KAPA probe fast qPCR Kit	Sigma-Aldrich
NucleoSpin® RNA Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
Pierce™BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
SuperSignal™West Dura	Thermo Fisher Scientific

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 Leberhistologie

Antigen	Klon	Wirtsspezies	Konjugat	Hersteller
Gespaltene Caspase-3	polyklonal	Kaninchen	unkonjugiert	Cell Signaling
Cyp1a2	polyklonal	Kaninchen	unkonjugiert	Proteintech
Cyp2e1	polyklonal	Kaninchen	unkonjugiert	Sigma-Aldrich
Ziege Anti-Kaninchen Sekundärantikörper	polyklonal	Ziege	AF647	Thermo Fisher Scientific

2.1.6.2 Magnetische Zellseparation

Antigen	Klon	Wirtsspezies	Konjugat	Hersteller
F4/80	BM8, polyklonal	Ratte	Biotin	BioLegend

2.1.6.3 Durchflusszytometrie

Antigen	Klon	Wirtsspezies	Konjugat	Hersteller
CD11b	M1/70, monoklonal	Ratte	APC Fire	BioLegend
CD45	A20, monoklonal	Maus	AF700	BioLegend
Ly6C	HK1.4, monoklonal	Ratte	PerCP/Cy5.5	BioLegend
Ly6G	1A8, monoklonal	Ratte	PE	BioLegend

2.1.6.4 Western Blot

Antigen	Klon	Ursprung	Konjugat	Hersteller
Cyp1a2	polyklonal	Kaninchen	unkonjugiert	Proteintech

Cyp2e1	polyklonal	Kaninchen	unkonjugiert	Sigma-Aldrich
Ziege Anti-Kaninchen Sekundärantikörper	polyklonal	Ziege	HRP	Cell Signalling
β-Actin Sekundärantikörper	polyklonal	Ziege	HRP	Santa Cruz

2.1.7 TaqMan-Sonden für die quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR) von Thermo Fisher Scientific

Gen	Kodiertes Protein	Sondennummer
<i>Ahr</i>	Ahr	Mm00478930_m1
<i>Ccl2</i>	CCL2	Mm00441242_m1
<i>Cyp1a2</i>	Cyp1a2	Mm00487224_m1
<i>Cyp2e1</i>	Cyp2e1	Mm00491127_m1
<i>Hprt</i>	HPRT	Mm01545399_m1
<i>Il18</i>	IL-18	Mm00434226_m1
<i>Il1b</i>	IL-1b	Mm00434228_m1
<i>Il6</i>	IL-6	Mm00446190_m1
<i>Itgam</i>	CD11b	Mm00434455_m1
<i>Ly6c1</i>	Ly6C	Mm03009946_m1
<i>Ly6g</i>	Ly6G	Mm04934123_m1
<i>Tnf</i>	TNF	Mm00443258_m1

2.1.8 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
10x Blotpuffer	144 g Glycin 30,3 g Trisbase 1 L H ₂ O
10x Laufpuffer	20 g SDS 288 g Glycin 60,6 g Trisbase 2 L H ₂ O
10x TBS	24,22 g Trisbase 175,32 g NaCl 2 L H ₂ O VE 14,5 ml HCL (13 M) PH 7,6
1x Blotpuffer	100 ml 10x Blotpuffer 200 ml Methanol 700 ml H ₂ O
1x PBS	KCl 2.7 mM KH ₂ PO ₄ 1.5 mM NaCl 137 mM

	Na ₂ HPO ₄ 6.5 mM
5x Lämmli	250 mM Tris Base 0,5 % Bromphenolblau 10 % Natriumlaurylsulfat (SDS) 50 % Glycerin 0,5 M Dithiothreitol (DDT)
ACK-Puffer	20,06 g NH ₄ Cl 2,5 g KHCO ₃ 0,5 M EDTA 250 ml H ₂ O Steril 1:10 mit H ₂ O verdünnen
MACS Puffer	1x PBS 0.5 % BSA EDTA 2.5 mM
NEM-Lösung	250 mM N-Ethylmaleimide 1,5 mg/ml Na ₂ -EDTA*2x H ₂ O In 3:2 H ₂ O/Methanol pH 7,4, eingestellt mit NaHCO ₃
TBST	100 ml 10x TBST 900 ml H ₂ O 0,05 % Tween

2.1.9 Software

Software	Hersteller
BD FACS Diva™ 8	BD Biosciences
BZ-II Analyzer	Keyence
BZ-II Viewer	Keyence
Endnote 20.1	Thompson Reuters
FlowJo 10	FlowJo LLC 2006-2018
Fusion FX6 EvolutionCapt	Vilber Labourmat Deutschland GmbH
Graph Pad Prism 9	GraphPad Software Inc.
ImageJ	Wayne Rasband
Microsoft Office	Microsoft Corporation
Nanodrop™ 2000/2000c, 1.6.198	Thermo Fisher Scientific
Tecan i-control™ 2.01	Tecan Trading AG
Tierbase TBv610b42	Abase, P. Nielsen
ViiA™ 7 Software 1.2.4	Applied Biosystems

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

In dieser Arbeit wurden Mäuse (*Mus musculus*) als Versuchstiere verwendet. Diese wurden in der Forschungstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) unter spezifiziert-pathogen-freien Bedingungen in individuell belüfteten Käfigen bei einer konstanten Raumtemperatur von 20 °C im Tag-Nacht-Zyklus von 12 Stunden gezüchtet und gehalten und hatten dabei *ad libitum* Zugang zu Standardfutter und Wasser. C57BL/6J Wildtyp-Tiere (WT) wurden von Charles River bezogen und nach 2-wöchiger Akklimatisierung in der Tierhaltung des UKE für die Experimente verwendet. Die Linien Ahr^{tm3.1Bra}/J und Lyz2^{tm1(cre)}Ifo/J wurden freundlicherweise von Francisco J. Quintana (Harvard Medical School, USA) zur Verfügung gestellt. Die Alb-Cre-Linie (B6.Cg-Speer6-ps1Tg(Alb-cre)21Mgn/J) wurde vom Jackson Laboratory bezogen. Die in dieser Arbeit verwendeten konditionalen Ahr-KO Mäuse (Ahr KO in myeloiden Zellen oder Hepatozyten) wurden auf dem C57BL/6_2014 Hintergrund durch Kreuzung Cre-Rekombinase-transgener Tiere (Lyz2^{tm1(cre)}Ifo/J oder B6.Cg-Speer6-ps1Tg(Alb-cre)21Mgn/J) mit geflochten Ahr-transgenen Mäusen (Ahr^{tm3.1Bra}/J) gezüchtet (siehe Tab. 1). Es wurden heterozygote Cre⁺/Cre⁻ Ahr fl/fl Tiere mit Cre⁻/Cre⁻ Ahr fl/fl Tieren verpaart. Somit waren alle Nachkommen homozygot für das geflochte Ahr-Allel, wobei 50 % die Cre-Rekombinase heterozygot exprimierten und somit Ahr-defizient waren, während die übrigen 50 % keine Cre-Rekombinase exprimierten und somit die Ahr-Expression unbeeinträchtigt blieb. Der Genotyp der Tiere wurde anhand genomischer DNA aus Schwanzbiopsien mittels PCR überprüft. Für alle Experimente wurden gleichgeschlechtliche (entweder männlich oder weiblich) 6-9 Wochen alte Mäuse verwendet. Um jeglichen Schaden zu minimieren, wurden bei den Tierversuchen gemäß dem "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" [230] humane Endpunkte definiert. Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit den behördlichen und institutionellen Richtlinien durchgeführt und von der "Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz, Fachbereich Veterinärwesen" des Landes Hamburg, Deutschland im Rahmen des Tierversuchsvorhabens N19/001 genehmigt.

Tab. 1: Auflistung der verwendeten Mauslinien

Mauslinie	Cre-Lox Treiber	Charakteristika
C57BL/6_2014		WT
Alb ^{Δ/ΔAhr} (B6.FVB(129)-Tg(Alb1-cre) Ahrtm3.1Bra)	LoxP-flankiertes Ahr Gen, Cre-Rekombinase Expression ist Albumin-Promotor- abhängig	Spezifische Deletion des Ahr- Gens in Hepatozyten
Lysm ^{Δ/ΔAhr} (B6.129P2-Lyz2tm1(cre) Ahrtm3.1Bra)	LoxP-flankiertes Ahr Gen, Cre-Rekombinase Expression ist Lysozym 2-Promotor- abhängig	Spezifische Deletion des Ahr- Gens in myeloiden Zellen

2.2.2 Applikation von Ahr-Liganden

Für die Aktivierung von Ahr wurde den Mäusen an zwei aufeinander folgenden Tagen jeweils zum selben Tageszeitpunkt die Dosis von 20, 67 oder 200 µg ITE, 1 µg FICZ oder die Vehikel Kontrolle (Maisöl) intraperitoneal (i.p.) mithilfe einer 1 ml Spritze und einer 23G Nadel injiziert (Abb. 6). Alle Liganden wurden vor der Verabreichung frisch in Maisöl gelöst und lichtgeschützt verwahrt.

2.2.3 Induktion einer APAP-induzierten Leberschädigung

Um eine APAP-abhängige Leberschädigung zu induzieren, ließ man die Mäuse zunächst zur Reduktion der GSH-Spiegel 16 Stunden vor der APAP-Injektion fasten. Das Gewicht der Tiere wurde dabei nach dem Fasten überprüft, um die APAP-Dosis gewichtsadaptiert anzupassen. Das APAP wurde für die Applikation in 1x PBS bei 56 °C für etwa 15 min gelöst, stetig vermischt und warmgehalten. Folgend wurden den Mäusen die Dosen von 0, 50, 100, 205 oder 350 mg/kg APAP per i.p. Injektion verabreicht (Abb. 6). Der Schweregrad der Erkrankung wurde in vier Kategorien mit jeweils vier Stufen bewertet: Augen offen (0) bis geschlossen (3), Fell glatt (0) bis struppig (3), Atmung normal (0) bis keuchend (3) und Mobilität normal (0) bis beeinträchtigt (3). Das Lebergewebe und Blut wurden 0, 5, 4 oder 8 Stunden nach der APAP-Behandlung entnommen. Zu diesem Zweck wurden die Mäuse durch kardiale Blutentnahme nach überdosierter Ketamin/Xylazin-Narkose (intraperitoneale Applikation von 15 ml/kg Maus (12 mg/ml Ketamin + 1,6 mg/ml Xylazin)), nachdem der Zwischenzehenreflex ausgesetzt hatte, getötet. Anschließend wurde die Bauchhöhle geöffnet, die Vena cava inferior durchtrennt und die Leber über die Vena portae etwa 30 sec mit 1x PBS perfundiert (6 ml/min). Daraufhin wurde die Leber vorsichtig entnommen und die Gallenblase entfernt. Für die weiteren

Untersuchungen wurde die Leber zerteilt. Der Lobus hepatis dexter medialis wurde für die mRNA-Isolation in kleine Stücke geschnitten sowie der kleinere Lobus hepatis dexter lateralis für die Immunhistochemie verwendet. Der Lobus quadratus und Lobus caudatus sowie Reste des Lobus hepatis dexter medialis wurden für die Protein-Extraktion genutzt. Alle genannten Leberlobuli wurden für die Analysen in flüssigem Stickstoff fixiert und konserviert und bis zur Analyse bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ verwahrt. Der Lobus hepatis sinister hingegen wurde in 4 % Formalin fixiert. Alle Eingriffe wurden während des Lichtzyklus durchgeführt.

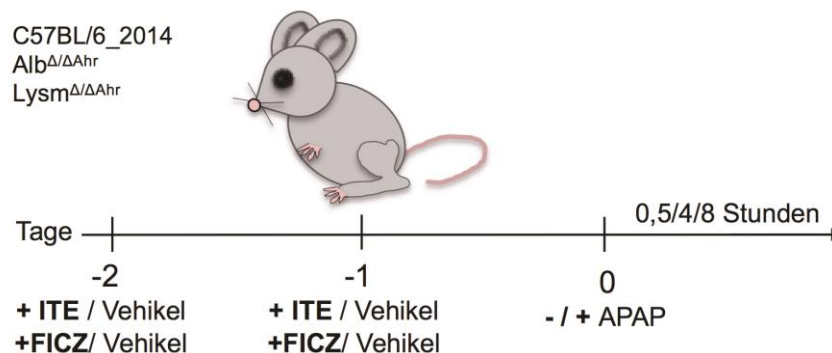


Abb. 6: Experimentelles Setup. WT-Mäuse, Lysm Δ/Δ Ahr oder Alb Δ/Δ Ahr Mäuse und ihre Wurfgeschwister wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen mit den Ahr-Liganden ITE (20, 67 oder 200 μg), FICZ (1 μg) oder Vehikel Kontrolle vorbehandelt. Die Analyse erfolgte 0,5, 4 oder 8 h nach der i.p. Injektion von APAP (0, 50, 100, 205 oder 350 mg/kg).

2.2.4 Serumgewinnung und Transaminasenbestimmung

Nach Durchtrennung der Vena cava inferior und vor der *in situ* Perfusion mit PBS wurde austretendes Vollblut mit einer 1 ml Spritze aspiriert und in einem 1,5 ml Tube aufgefangen und zur Gerinnung etwa 30 min bei RT belassen. Zur Aufbereitung des Serums wurde das koagulierte Blut folgend bei 1000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und erneut bei 1000 g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum aliquotiert und bis zur weiteren Analyse bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Als Maß für die Leberschädigung wurden die Transaminasen Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) im Serum bestimmt. Beide Transaminasen fungieren als Enzyme, die den Austausch von Aminogruppen zwischen Aminosäuren und α -Ketosäuren im Citratzyklus katalysieren und kommen überwiegend intrazellulär vor. Die ALT ist besonders im Zytosol von Hepatozyten hoch konzentriert wohingegen die AST im Zytosol und den Mitochondrien von Hepatozyten als auch in Herz- und Skelettmuskelzellen, Gehirn, Niere und Pankreas vorkommt. Sterben die Zellen bei Gewebeschädigung ab, gelangen die Enzyme ALT und AST in den

Blutkreislauf. Somit spielen beide Transaminasen eine wichtige Rolle bei der Diagnostik und Verlaufsbeurteilung von Lebererkrankungen, wobei besonders die ALT als sehr spezifischer Indikator gilt. Für die Konzentrationsbestimmung der beiden Transaminasen wurden die Serumproben zunächst auf Eis aufgetaut und folgend 1:5 in H₂O (25 µl Serum und 100 µl aqua dest.) verdünnt. Die ALT- und AST-Konzentration der Proben wurde am Institut für Experimentelle Immunologie und Hepatologie, UKE netterweise von Carsten Rothkegel (Arbeitsgruppe Tiegs) mit dem COBAS Mira System bestimmt.

2.2.5 Leberhistologie

Nach der *in situ* Perfusion wurden die Leberproben entweder unmittelbar mit Formaldehyd fixiert und in Paraffin konserviert (siehe 2.2.5.1) oder kryofixiert (siehe 2.2.5.3), um jeweils unterschiedliche Färbetechniken durchführen zu können. In dem nachstehenden Abschnitt werden die in dieser Arbeit verwendeten einzelnen Methoden näher beschrieben.

2.2.5.1 Prozessierung von in Paraffin konserviertem Gewebe

Für die auf Paraffin basierenden Histologietechniken wurde der *in situ* perfundierte Lobus sinister nach der Entnahme in einer Histologie-Einbettkassette über Nacht in Roti®-Histofix 4 % fixiert. Am Folgetag wurden die Proben für die Entwässerung nach dem unten aufgezeigten Protokoll (Tab. 2) und für das Einbetten mit Paraffin in die Pathologie des UKEs gebracht.

Tab. 2: Entwässerungsprotokoll der Pathologie UKE

	Formalin	Ethanol						Xylol		Paraffin				
	60	80 %		96 %		100 %			I	II	A	B	C	D
Zeit [min]		30	40	30	40	30	40	50	40	60	20	30	40	60

Die in Paraffin eingebetteten Leberproben wurden vor dem Schneiden zunächst auf einer Kühlplatte bei -8 °C heruntergekühlt und ggf. nachfolgend für weitere 10 min auf Eis gelegt. Anschließend wurden mithilfe eines Mikrotoms 3 µm dicke Leberschnitte angefertigt. Für die Streckung der Schnitte wurden diese in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt, bevor sie abschließend auf einen Objektträger aufgezogen und für 24 Stunden auf einer 37 °C warmen Wärmeplatte getrocknet wurden.

2.2.5.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E)

Diese Färbung besteht aus einer Kombination von zwei Einzelfärbungen mit Hämatoxylin und Eosin. Das Hämatoxylin wird als natürlicher Farbstoff von allen basophilen Strukturen wie DNA, Ribosomen, rauem Endoplasmatisches Retikulum (ER) und Zellkernen gebunden und färbt sie selektiv blau. Das Eosin hingegen ist ein synthetischer saurer Xanthin Farbstoff, welcher von acidophilen Strukturen wie den Proteinen des Zytoplasmas, Mitochondrien, Kollagen und glattem ER gebunden wird und eine pink-rote Färbung erzeugt. Die Schnitte wurden zu Beginn anhand einer dreiteiligen Xylolreihe (Xylolbad für jeweils 4 min) entparaffinisiert und mit einer absteigenden Ethanolreihe (100 %, 90 %, 70 %, 50 % für jeweils 4 min) rehydriert. Nachdem die Schnitte für 5 min in VE-H₂O gespült wurden, folgte eine Inkubation für 10 min im Hämatoxylin-Bad und ein anschließendes Bläuen für 15 min mit Leitungswasser. Dabei bildet das Hämatoxylin in wässriger Lösung mit Metallionen stark basische Chelate von blauvioletter Farbe. Für die Eosin-Färbung wurden die Schnitte daraufhin für 1-2 min im Eosin-Bad inkubiert. Nach einem kurzen Waschen in VE-H₂O, wurden die Leberschnitte mithilfe einer aufsteigenden Ethanolreihe (30 Sekunden in 50 %, 30 Sekunden in 70 %, 1 min in 90 % und zweimal 2 min in 100 %) dehydriert und abschließend dreimal für 4 min in Xylol inkubiert. Die fertig gefärbten Leberschnitte wurden dann, um die Haltbarkeit der Schnitte zu gewährleisten, mit Entellan® und einem Deckgläschen eingedeckt und bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.5.3 Gespaltene Caspase-3-Färbung

Zur Bestimmung der apoptotischen Zellen wurde eine immunhistochemische Färbung von gespaltener Caspase-3 durchgeführt. Der Antikörper detektiert spezifisch endogene Konzentrationen des großen Fragments (17/19 kDa) der aktivierten Caspase-3, das durch die Spaltung entsteht. Wie in 2.2.5.2 beschrieben wurden die Leberschnitte zunächst anhand einer dreiteiligen Xylolreihe entparaffinisiert und mit einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert. Anschließend wurde eine Antigendemaskierung (Antigen-Retrival) durchgeführt, welches die Maskierung von Epitopen des Gewebes durch die Formalin-Paraffin-Konservierung beseitigen soll. Die Schnitte wurden hierfür 20 min in Citratpuffer gekocht und daraufhin dreimal mit PBS für 3 min gewaschen. Nachdem die Leberschnitte mit einem Fettstift (Dako Pen) umrandet und in eine feuchte Kammer überführt wurden, erfolgte ein Blockschritt mit Peroxidase für 10 min und ein weiterer Serumblockschrift mit „Dako Protein Block“ für 60 min im Dunkeln. Folgend wurden die Schnitte dreimal mit PBS für 3 min gewaschen und mit dem gespaltene

Caspase-3 Primärantikörper 1:100 in „Dako Antibody Diluent“ über Nacht in der Feuchtkammer bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte wieder ein Waschschrift mit zweimal PBS-T und einmal PBS für 3 min und ein weiteres Blocken mit Ziegen Serum (Dako Goat Serum) 1:100 in PBS für 10 min, bevor die Leberschnitte für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper Ziege-Anti-Kaninchen-HRP in „Dako Antibody Diluent“ in der dunklen Feuchtkammer inkubiert wurden. Schließlich wurden die Schnitte nach dem Waschen mit DAB-HRP für etwa 1 min, bis sie eine ausreichende Braunfärbung aufwiesen, entwickelt. Bevor die Schnitte dreimal für 2 min in VE-H₂O gewaschen wurden, kam es zum Abstoppen der Reaktion durch VE-H₂O. Daraufhin erfolgte eine Gegenfärbung der Zellkerne für 1-2 min mit Hämatoxylin (siehe 2.2.5.2). Abschließend wurden die gefärbten Leberschnitte mit einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert, in der dreiteiligen Xylolreihe inkubiert, mit Entellan eingedeckt und bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.5.4 TUNEL-Assay

Zusätzlich wurde zur Detektion apoptotischer Zellen das terminale Desoxynukleotidyltransferase-anhängige dUTP-Nick-End-Labeling (TUNEL) auf paraffinkonservierten Leberschnitten angewendet. Der Nachweis von abgestorbenen Zellen basiert dabei auf den Doppelstrangbrüchen in der DNA. Die terminale Desoxynukleotidyltransferase ist ein Enzym, das spezifisch Doppelstrangbrüche bindet und die Anlagerung von fluoreszenzmarkierten Desoxynukleotiden an die 3'-Hydroxyl-Termini von DNA-Doppelstrangbrüchen katalysiert. Somit wiesen tote Zellen im Fluoreszenzmikroskop eine rote Färbung auf. Auch hier wurden die Schnitte wie in 2.2.5.2 beschrieben zunächst mit einer dreiteiligen Xylolreihe entparaffinisiert und folgend mit einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert. Anschließend wurden die Leberschnitte nach einem PBS-Waschschrift mit einem Fettstift (Dako Pen) umrandet und in einer Feuchtkammer für 25 min bei 37 °C mit 20 µg/ml permeabilisiert. Daraufhin wurden die Schnitte dreimal mit PBS für 3 min gewaschen und die TUNEL-Reaktion mit dem „*In situ* Cell Death Detection Kit, TMR Red“ gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Auch wurde in diesem Schritt eine Positivkontrolle eingeschlossen, in der mithilfe von DNase I für 10 min bei 37 °C DNA- Doppelstrangbrüche generiert wurden. Im Anschluss an die TUNEL-Reaktion wurden die Leberschnitte dreimal mit PBS für 3 min gewaschen und die Zellkerne mit dem Kernfarbstoff Hoechst 33258 1:10.000 in PBS für 1

min gegengefärbt. Die fertigen Leberschnitte wurden in Dako-Fluoreszenzmedium eingedeckt und im Dunkeln 24 Stunden bei 4 °C ausgehärtet und gelagert.

2.2.5.5 Prozessierung von kryokonservierten Gewebe

Bei der Kryokonservierung wurde jeweils immer der nach der *in situ* Perfusion entnommene Lobus hepatis dexter lateralis in flüssigen Stickstoff fixiert und bei -80 °C gelagert. Das Schneiden der Leber erfolgte mithilfe eines Kryostaten, welcher 30 min vor dem Schneiden auf ca. -15 °C (Einstellung für Kammer- und Objektkopf Temperatur) heruntergekühlt wurde. Des Weiteren wurden alle benötigten Werkzeuge, wie Rasierklinge, Pinzette und Pinsel zum Vorkühlen und für eine bessere Handhabung während des späteren Schneidens in der Kryostatkammer gelagert. Anschließend wurde die Leberprobe auf etwas Tissue-Tek® auf der Objektplatte eingebettet. Daraufhin verblieb die Objektplatte inklusive Probe auf der Gefrierleiste bis auch die Probe komplett durchgefroren war. Die Objektplatte wurde dann in den Objektkopf eingespannt und die darauf eingebettete Probe wurde mit einer Schnittdicke von 10-20 µm im Trimm-Modus zunächst gewebesparend angeschnitten bis eine gerade Schnittkante entstand. Folgend wurden 6-8 µm dicke Leberschnitte hergestellt. Die Proben wurden mit einem feinen Pinsel auf die Adhäsiv-Objektträger überführt und im Anschluss bis zu ihrer weiteren Behandlung liegend eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Wenn die Schnitte nicht sofort für weitere Färbungen verwendet wurden, wurden sie bei -80 °C gelagert.

2.2.5.6 Immunfluoreszenz-Färbung

Für die Immunfluoreszenz-Färbungen wurden die Gefrierschnitte zunächst in Küvetten mit -20 °C kalten 1:1 Aceton/Methanol für 5 min bei -20 °C fixiert. Anschließend wurde das Aceton/Methanol für etwa 5 min bei Raumtemperatur abgedampft und die Leberschnitte folgend mit einem Fettstift (Dako Pen) umrandet. Daraufhin wurden die Schnitte, um das Reaktionsmilieu zu optimieren, für 5 min bei Raumtemperatur in Küvetten mit PBS und für eine verstärkte Permeabilisierung nochmals für 20 min mit PBS/1 % Triton inkubiert. Daraufhin wurden die Leberschnitte dreimal für 5 min bei Raumtemperatur mit PBS gewaschen. Hiernach wurden die Objektträger mit den Schnitten vom überschüssigen PBS befreit und sofort in eine dunkle Feuchtkammer überführt, wo sie zum Blocken unspezifischer Bindungen mit 1:500 Fc-Block in PBS/1 % BSA für 30 min inkubierten. Nachdem die Organschnitte dreimal für 5 min mit PBS

gewaschen wurden, wurden sie mittels einer Zwei-Schritt-Färbung behandelt. Dabei wurde zunächst der Primärantikörper gegen Cyp1a2 oder Cyp2e1 jeweils 1:200 verdünnt in PBS/1 % BSA auf die Schnitte pipettiert und über Nacht bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Am Folgetag wurden die Proben dreimal für 5 min mit PBS-T gewaschen und anschließend für 45 min mit Sekundärantikörper 1:500 in PBS inkubiert. Es folgten weitere Waschschrte mit dreimal PBS-T für 5 min. Alle Waschschrte sollten die Leberschnitte von anderen Serumproteinen befreien und einen möglicherweise entstehenden Hintergrund klären. Die Leberschnitte wurden zum Schluss mit Hoechst 33258 Kernfarbstoff 1:10.000 in PBS für 1 min gegengefärbt und in Dako-Fluoreszenzmedium mit einem Deckgläschen eingedeckt. Die fertigen Leberschnitte wurden im Dunkeln 24 Stunden bei 4 °C bis zur Ansicht unter dem Mikroskop ausgehärtet und gelagert.

2.2.5.7 Quantitative Auswertung der Leberhistologie

Die Schnitte wurden mit einem Biorevo Keyence BZ-9000 Mikroskop mit Objektiven von Nikon (Apo 2x/0,10, OFN25 WD 8,5; Plan Apo 10x/0,45 ∞ /0,17 WD 4,0; Plan Apo 20x/0,75 ∞ /0,17 WD 1,6) und dem Keyence BZ II Viewer und der Analyzer Software fotografiert und bearbeitet. Der durch die gespaltene Caspase-3 und TUNEL-Färbung detektierte Zelltod wurde jeweils durch das Zählen der einzelnen Zellen, die für das entsprechende Signal positiv waren, mit der Software ImageJ quantifiziert. Hierfür wurde eine Übersicht der gesamten Leber mit 10 bis 15 Bildern in der 10x Vergrößerung erstellt. Dabei wurden die Einstellungen für den Weißabgleich sowie die Belichtungszeit innerhalb eines Experiments immer gleich ausgewählt. Die Fotos wurden mit dem ImageJ Programm im JPEG Format in eine Grauskalierung (schwarz/weiß/grau) konvertiert und anschließend mit einer Farb-Dekonvolution in die Kanäle blau/rot/grün aufgetrennt, wobei hier anschließend der kontrastreichste Kanal und ein entsprechender Schwellenwert für die Auswertung ausgewählt wurden. Der Hintergrund war dabei ungefärbt und die gefärbten Areale erschienen deutlich abgegrenzt. Zusätzlich wurden die Bilder hinsichtlich der positiven Signale mit den Originalen abgeglichen. Die gefärbten Bereiche wurden so optimal und realitätsgetreu für die Software markiert. Der Anteil bzw. die Partikelgröße der gefärbten Bereiche wurde dann von ImageJ für jedes Bild errechnet, wobei auch der Schwellenwert für die Partikelgröße (Infinity) ggf. angepasst

wurde. Die errechnete Anzahl an positiven Events in einer Leber wurde abschließend aus den Mittelwerten aller einzelnen Bilder gebildet.

2.2.6 Proteinnachweis mittels Western Blot

Der Western Blot ermöglicht eine Identifizierung und Quantifizierung spezifischer Proteine innerhalb eines Proteingemisches. Die Detektion erfolgt mithilfe von Antikörpern, die spezifisch an die Epitope des auf der Membran fixierten Zielproteins binden. Der Western Blot setzt sich grundlegend aus der Auftrennung des Proteingemisches mittels Gelelektrophorese, dem Transfer der Proteine auf eine Membran und der Proteindetektion zusammen. Im folgenden Abschnitt wird die Durchführung der Methode weiter ausgeführt.

2.2.6.1 Herstellung eines Proteingemisches

Um den Nachweis bestimmter Proteine in den Leberproben mittels Western Blot durchführen zu können, mussten zunächst die Gesamtproteine aus den jeweiligen Proben isoliert werden. Für die Proteinisolation wurde kryofixiertes Lebergewebe (siehe 2.2.3, etwa 20-30 mg) mit 200-300 µl „T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent“ und Proteinase-Inhibitoren auf Eis lysiert. Dabei erfolgte die Zerkleinerung des Gewebes bei 4 °C mit einer Kugelmühle („Tissue-Lyser“) und es wurde abschließend eine Zentrifugation mit 13.000 rpm bei 4 °C durchgeführt. Die Gesamtproteinkonzentration des aus dem Überstand gewonnenen Lysates wurde mit dem „Pierce™ BCA Protein Assay Kit“ nach Herstellerangaben bestimmt. Anhand einer doppelt angesetzten Standardreihe mit definierter Konzentration, konnte die Proteinmenge für jede Probe errechnet werden, die zuvor als optische Dichte (OD) am ELISA Reader INFINITY F50 bei 560 nm gemessen wurde. Anschließend wurden 20 µg Protein in 35 µl destilliertem H₂O und 5x Lämmli-Puffer verdünnt. Die Proteinproben wurden dann für 5 min bei 95 °C denaturiert und auf Eis gestellt oder für die spätere Verwendung bei -20 °C verwahrt.

2.2.6.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um die gewünschten Proteine nachweisen zu können, mussten sie nach ihrer Aufreinigung und Denaturierung zunächst einmal mit einer diskontinuierlichen zwölfprozentigen SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Hierbei handelt es sich als analytische Methode um eine Variante der Polyacrylamid-Gelelektrophorese, bei der es

zur Trennung eines Stoffgemisches nach der Molekülmasse in einem elektrischen Feld kommt. Die Zusammensetzung der hierfür hergestellten SDS-Page-Gele ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tab. 5: Zusammensetzung der Gele für die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

WB Gel (1,5 mm)	Zusammensetzung
Trenngel 12 % Stock	24 ml H ₂ O 30 ml Acrylamid 40 % 25 ml 1,5M Tris pH 8,8 1 ml 10 % SDS 20 ml Glycerol
Trenngel	7,5 ml 12 % Trenngel Stock 18,75 µl APS 9,38 µl TEMED
Sammelgel Stock	74 ml H ₂ O 12,5 ml Acrylamid 40 % 12,5 ml 1,5M Tris pH 6,8 1 ml 10 % SDS
Sammelgel	3,75 ml Sammelgel Stock 15 µl APS 7,5 µl TEMED

Für die diskontinuierliche zwölf prozentige SDS-Page wurden Gele, bestehend aus einem Trenn- und Sammelgel, mit einer Stärke von 1,5 mm gegossen. Es wurde hierbei ein Kamm für 10 oder 15 Beladungstaschen verwendet. Das auspolymerisierte Gel wurde anschließend in ein Gelelektrophorese-System eingespannt und die Kammer wurde mit 1x Laufpuffer befüllt. Jede Tasche wurde mit 20 µg Protein oder 5 µl „PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder“ beladen. Der Marker diente dazu, ein Proteinbandenprofil anhand des Molekulargewichts zu definieren. In dem Gellauf wurden die Proteine zunächst für 10-15 min bei 100 V gesammelt und anschließend bei 160 V für 60-90 min aufgetrennt.

2.2.6.3 Proteintransfer und Detektion

Die im Gel enthaltenen aufgetrennten Proteine wurden mittels Wet-Blot auf eine Nitrocellulose-Blotting-Membran durch nassen Elektrotransfer übertragen. Hierfür wurde zunächst das Sammelgel entfernt und nur das Trenngel zusammen mit der Membran als Sandwich Aufbau in das Blot-System eingespannt und die Kammer mit 1 x Blotpuffer befüllt. Der Transfer erfolgte in der Regel für 1 Stunde bei 300 mA. Um später auch die Ziel-Proteine detektieren zu können, wurde die Blotdauer an die Größe

der zu analysierenden Proteine angepasst. Dementsprechend war ein Transfer für sehr kleine Proteine kürzer. Anschließend wurden die Membranen nach einer 15-minütigen Lufttrocknung für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 5 % Magermilchpulver in TBS mit 0,05 % Tween® 20 (TBS-T) auf dem Kombischüttler geblockt und mit den primären Antikörpern gegen Actin-HRP, Cyp2e1 oder Cyp1a2 in 5 % fettfreier Trockenmilch in TBS-T über Nacht auf dem Rollenmischer bei 4 °C inkubiert. Nachdem die Membran am nächsten Tag 3x für je 5 min in TBST auf dem Rollenmischer gewaschen wurde, inkubierte die Membran bei Raumtemperatur für 1 Stunde mit den entsprechenden sekundären Meerrettichperoxidase-konjugierten (HRP) Antikörpern. Nach drei weiteren Waschschritten in TBST wurden die Protein-Antikörper-Komplexe mit dem „SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate“ nachgewiesen und mit dem Fusion FX6-System (Vilber) und der Fusion FX6-Software detektiert und visualisiert. Um ein weiteres Protein auf derselben Membran zu detektieren, wurden nach einem Waschschriff die zuvor spezifisch gebundenen Antikörper auf der Membran mithilfe des Roti®-Free Stripping-Puffer 2.2 plus für 20-30 min auf dem Rollenmischer abgelöst. Nach einem weiteren Waschschriff mit TBST für 5 min auf dem Kombischüttler und einer wiederholten Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen in 5 % Magermilchpulver in TBST für 30 min konnte die Membran wie vorher beschrieben erneut mit einem Primärantikörper inkubiert werden.

2.2.6.4 Quantitative Auswertung des Western Blots

Für die quantitative Auswertung der detektierten Proteine wurden die Proteinbanden von mindestens drei unabhängigen Blots verwendet. Dabei wurden die durchschnittlichen Verhältnisse der integralen optischen Dichte quantifiziert und auf die Housekeeper-Kontrolle Actin normalisiert. Hierfür wurde zunächst ein Normalisierungsfaktor für die Banden gebildet, um die Experiment-abhängigen Intensitätswerte zu normalisieren. Dabei wurde das stärkste Bandensignal des Housekeeping-Proteins verwendet, um den Rest der Housekeeping-Banden auf dem Blot zu normalisieren. Der Banden-Normalisierungsfaktor errechnet sich aus der Division des detektierten Signals des Housekeeping-Proteins für jede Bande mit dem stärksten Bandensignal des Housekeeping-Proteins auf dem Blot. Zur Berechnung des normalisierten Signals jeder einzelnen experimentellen Zielbande wurden die detektierten Signalintensitäten jeder experimentellen Zielbande durch den Banden-Normalisierungsfaktor geteilt.

2.2.7 RNA-Isolation und quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Um die Genexpression in den Proben anhand von qPCR zu analysieren, wurde die RNA mithilfe des NucleoSpin® RNA Kits nach Herstellerangaben aus Gewebe oder Zellen isoliert und anschließend mittels Nanodrop™ 2000 mit 1 µl auf ihre Konzentration und Qualität geprüft. Folgend wurde 1-2 µg RNA mit dem „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ in ihre komplementäre DNA (cDNA) transkribiert. Die reverse Transkription der cDNA wurde mit dem in der Tab. 3 aufgeführten Programm im Thermocycler durchgeführt.

Tab. 3: Programm zum Umschreiben der mRNA in cDNA

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

Der hergestellte cDNA-Ansatz wurde 1:4 oder 1:8 in Nuklease-freiem Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert. Zur Bestimmung des relativen Expressionsniveaus der zu untersuchenden Gene wurde die qPCR mit TaqMan-Sonden durchgeführt. Hierfür wurde für jede zu analysierende Probe jeweils 4,3 µl verdünnte cDNA und 5,7 µl vom zuvor vorbereiteten Mastermix mit TaqMan-Sonde und den Bestandteilen des KAPA Probe Fast qPCR Kits nach Herstellerangaben in eine spezielle 96-Well-Platte auf Eis pipettiert. Abschließend wurde die Platte kurz zentrifugiert, um Luftblasen zu entfernen und mit einer durchsichtigen Folie abgedeckt. Die qPCR-Reaktionen wurden in Duplikaten mit dem ViiA 7 Real-Time PCR-System unter Verwendung eines voreingestellten Protokolls durchgeführt (Tab. 4).

Tab. 4: qPCR-Protokoll des ViiA 7 Real-Time PCR-Systems

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [Sekunden]	Zyklen
Initiierung	95	20	1
Denaturierung	95	1	40
Annealing u. Elongation	60	20	

Um die Genexpression zu quantifizieren, wurde zunächst die gemessene Expression des Zielgens auf das Housekeeping-Gen Hprt normalisiert, indem der Ct-Wert des Housekeeping-Gens von dem Ct-Wert des Zielgens subtrahiert wurde (ΔCt). Daraufhin wurde die relative Expression mit der $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ -Methode berechnet.

2.2.8 Bestimmung der GSH-Level in der Leber

Entsprechend Sezgin et al. [66] wurde für die Bestimmung der GSH-Level der Analysezeitpunkt 30 Minuten nach der APAP-Injektion gewählt, da bereits innerhalb der ersten 120 Minuten der größte Teil der Ausgangsverbindung aus dem Kreislauf ausgeschieden wird. Für die GSH-Messung wurden etwa 25 mg schwere Leberstücke in 100 µl NEM-Lösung mit einem Kunststoffstößel für 2 min zerkleinert, anschließend für 20 Sekunden gevortext und in flüssigem Stickstoff fixiert. Die Proben wurden bis zur Messung bei -80 °C gelagert. Die Konzentration des Gesamt-GSH-Gehalts, welcher sich aus dem reduzierten und oxidierten GSH zusammensetzt, wurde im Leberhomogenisat am Leibniz-Forschungszentrum für Arbeitswelt und Humanfaktoren (IfADo), Dortmund, Deutschland, mittels Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS) bestimmt. Dabei wird zunächst anhand der Flüssigkeitschromatographie ein Stoffgemisch aufgetrennt, welches anschließend über die Massenspektrometrie-Kopplung exakt identifiziert und quantifiziert werden kann. Die Ergebnisse wurden auf das eingesetzte Lebergewicht normalisiert.

2.2.9 Bestimmung von APAP-Addukten

Wie bereits in 2.2.8 erläutert, wurden die Serumproben für die Analyse der APAP-Addukte ebenfalls 30 Minuten nach der APAP-Behandlung gewonnen. Die Konzentrationen von APAP sowie dessen Metabolite (APAP-Glucuronid (APAP-GLC), APAP-Sulfat (APAP-SUL)) und Addukte (APAP-Glutathion (APAP-GSH), APAP-Cystein (APAP-CYS), APAP-N-Acetylcystein (APAP-NAC) wurden im Blutplasma am Zentrum für Massenspektrometrie (CMS), Fakultät für Chemie und Chemische Biologie, TU Dortmund, Dortmund, Deutschland, mittels Kopplung von Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS), wie in Sezgin et al. [66] beschrieben, gemessen.

2.2.10 Isolation von nicht-parenchymalen Leberzellen

Die Isolation von nicht-parenchymalen Leberzellen (NPCs) wurde mit dem zuvor *in situ* perfundierten Lobus quadratus und Lobus caudatus durchgeführt, der nach der Entnahme auf Eis in IMDM Medium gelagert wurde. Mithilfe eines 100 µm Zellsiebs wurde aus den Lobuli eine Einzelzellsuspension hergestellt. Um diese von Hepatozyten zu befreien, wurde die Zellsuspension bei 40 g für 4 min bei Raumtemperatur (RT)

zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in ein neues 50 ml Falcon überführt und erneut zentrifugiert, um weiter sukzessiv eine mögliche Kontamination durch unerwünschte Zellen zu minimieren. Der nun final erhaltene Überstand wurde bei 430 g für 7 min bei RT zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Zellpellet in einem 15 ml Falcon mit 4,5 ml PBS resuspendiert und mit 2,5 ml des Dichtegradientenmediums OptiPrep vermischt und vorsichtig mit 1 ml PBS überschichtet. Die Dichtegradientenzentrifugation wurde bei 400 g für 20 min ohne Bremse bei RT durchgeführt. Die verschiedenen Zellpopulationen wurden in verschiedene Dichtezonen bzw. distinkte Banden fraktioniert. Die Schicht der NPCs wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und einmal mit PBS bei 430 g für 7 min gewaschen. Die in der abgenommenen Fraktion noch enthaltenen Erythrozyten wurden mittels 1 ml ACK-Puffer für 1 min bei RT lysiert. Durch Zugabe von PBS wurde die Erythrozytenlyse abgestoppt und es folgte eine Zentrifugation bei 430 g für 7 min bei RT. Die Zellen wurden nachfolgend in 1 ml IMDM Medium aufgenommen und in einer 1:10 Verdünnung mit Trypanblau mithilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt. Vitale Zellen, die nicht von Trypanblau angefärbt wurden, wurden bei 40x Vergrößerung in 2 Großquadraten unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Gesamtzellzahl wurde nach der Formel: $\text{Zellzahl/Volumen} = (\text{gezählte Zellen im Großquadrat} / \text{Anzahl der gezählten Großquadrate}) * \text{Kammerfaktor} * \text{Verdünnungsfaktor}$ berechnet. Die isolierten NPCs wurden dann wie in 2.2.12 beschrieben weiter prozessiert.

2.2.11 Isolation von Kupffer-Zellen

Die Isolation von Kupffer-Zellen (KCs) erfolgte per *in situ* Perfusion der Leber mit 0,05 % Kollagenasepuffer. Nach der Entnahme wurde die Leber auf Eis in GBSS-Puffer gelagert und mithilfe einer Schere zu einem homogenen Gewebepulver zerkleinert. Dieser wurde anschließend mit 2-3 ml Kollagenasepuffer aufgeschwemmt und in einem 50 ml Falcon mit 1 µl Dnase 1 (1000 U/ml) für 25 min bei 37 °C im Wasserbad verdaut. Anschließend wurde mit einem 100 µm Metallsieb eine Einzelzellsuspension hergestellt, welche zweimal über eine Zentrifugation bei 40 g für 4 min von Hepatozyten befreit wurde. Der Überstand mit den enthaltenen NPCs wurde dann bei 430 g für 7 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde für die Vorbereitung des Dichtegradienten in einem 15 ml Falcon in 5 ml PBS resuspendiert, mit 2 ml OptiPrep vermischt und final mit 1 ml PBS überschichtet. Wie in 2.2.10 beschrieben erfolgte auch hier eine Dichtegradientenzentrifugation, bei der im Anschluss die NPC-Bande abgenommen wurde. Nach einem Waschschrift bei 430 g für

7 min wurde das Zellpellett für die Separierung der KCs mittels Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) in 1 ml MACS Puffer resuspendiert und für 10 min bei 4 °C mit 1 µl Maus IgG inkubiert. Daraufhin erfolgte erneut ein Waschschrift mit MACS-Puffer. Das Zellpellett wurde entsprechend der Anleitung von Miltenyi Biotec in 100 µl MACS-Puffer pro 1×10^7 Zellen aufgenommen und für 15 min bei 4 °C mit 1 µl pro 1×10^7 Zellen F4/80-Biotin-Antikörper inkubiert. Nach einem weiterem Waschschrift wurde für die magnetische Markierung der F4/80-positiven KC 10 µl Streptavidin MicroBeads pro 1×10^7 Zellen für 15 min zugegeben und bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die KC über eine MS-Säule im OktoMACS-Magneten aufgereinigt. Dabei erhielt man durch eine Positivselektion die gewünschte F4/80-positive KC-Population, die in der MS-Säule magnetisch festgehalten wurde. Für die Elution wurde die MS-Säule aus dem Magnetständer entfernt und die KC wurden mit 1 ml MACS-Puffer von der Säule gewaschen. Die Zellfraktion wurde zuletzt, wie in 2.2.10 beschrieben, gezählt und mittels Lysispuffer für die Folgeversuche, wie in 2.2.7 erläutert, vorbereitet.

2.2.12 Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie oder auch „Fluorescence-Activated-Cell-Sorting“ (FACS) beruht darauf, dass einzelne Zellen innerhalb kürzester Zeit in einem laminaren Probenstrom an einem Laser vorbeigeleitet werden. Dabei wird durch die Zellen eine Lichtstreuung erzeugt, die anhand von Detektoren nachweisbar ist. Somit kann auf ihre Größe und Granularität geschlossen werden. Darüber hinaus werden die Zellen in der Regel mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert, die durch den Laser angeregt werden und das Licht in einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Somit erhält man ein spezifisches Signal für jeden unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff, der zusammen mit dem Antikörper gegen bestimmte zelluläre Strukturen gerichtet ist. Die Durchflusszytometrie ermöglicht also eine Charakterisierung der Zellen anhand ihrer Größe, Struktur und Oberflächeneigenschaften sowie auch ihrer intrazellulären Proteine.

2.2.12.1 Lebend-Tod-Färbung

Zum Ausschluss toter Zellen wurde der Farbstoff Pacific Orange Succinimidyl Ester (PacO-NHS) verwendet. Sterbende oder bereits tote Zellen haben keine intakte Zellmembran mehr, über diese dringt das PacO-NHS ein und bindet freie Amine, hingegen bleiben lebende und vitale Zellen ungefärbt. Für die Lebend-Tod-Färbung wurden etwa 1

$\times 10^6$ Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und in 200 μ l der 1:1000 PacO-NHS in PBS Verdünnung resuspendiert. Die Inkubation erfolgte für 20 min bei 4 °C im Dunkeln.

2.2.12.2 Oberflächenfärbung

Um extrazelluläre Oberflächenantigene der Zellen zu färben, folgte nach der oben beschriebenen Lebend-Tod-Färbung (2.2.12.1) ein Waschschrift mit 1 ml PBS und eine Zentrifugation bei 400 g für 5 min. Die Zellen wurden dann in 100 μ l Antikörper Mastermix (1:200 in MACS-Puffer) aufgenommen und bei 4 °C für 15 min im Dunkeln inkubiert. Hieran schloss sich wieder ein Waschschrift an, gefolgt von einer Fixierung der Zellen für 15 min mit 100 μ l 4 % PFA bei 4 °C im Dunkeln. Nach einem letzten Waschschrift wurden die fixierten Zellen in 250 μ l PBS bis zur Messung am Durchflusszytometer, die in der Regel am nächsten Tag erfolgte, bei 4 °C dunkel gelagert.

2.2.12.3 Messung am Durchflusszytometer

Die Proben wurden an einem LSRII Durchflusszytometer mit dem Programm BD FACS Diva™ 8 gemessen und später mit der Software FlowJo 10 ausgewertet. Da es bei der Mehrfarbenanalyse immer spektrale Überlappungen zwischen den Emissionswellenlängenbereichen der verschiedenen Fluorochrome geben kann, ist für eine aussagekräftige Datenanalyse der gemessenen Proben eine Kompensation unerlässlich, denn mit dieser lassen sich mögliche spektrale Überlappungen rechnerisch über die Auswertungssoftware korrigieren. Die Kompensationsproben wurden aus einem Tropfen OneComp eBeads™, welche als sphärische Partikel unabhängig von Immunglobulin-Leichtketten eine negative und positive Population beinhalten und 1 μ l des jeweiligen verwendeten Fluorochrom-gekoppelten Antikörpers hergestellt. Für die PacO-NHS Kompensation wurden übergebliebene Zellen gezielt durch Erhitzen bei 56 °C für 30 min abgetötet und wie in 2.2.12.1 gefärbt. Für die graphische Auswertung wurden sogenannte Dot-Plots erstellt, in denen jeder einzelne Punkt eine gemessene Zelle darstellt. Mithilfe der Gating-Strategie (Abb. 7) konnte auf die zu untersuchende Zellpopulation und ihre Eigenschaften geschlossen werden. Hierfür wurden zunächst die Dubletten durch Auftragen der Höhe (H) gegen die Fläche (A) der Vorwärtsstreuung des Lichts (FSC) dargestellt. Zellen, die sich außerhalb der Winkelhalbierenden befanden, wurden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Anschließend konnten mit Hilfe des FSC-A und der Seitwärtsstreuung des Lichts (SSC) Zelltrümmer ausgeschlossen

werden und die Zellen entsprechend ihrer Größe und Granularität ausgewählt werden. Im nächsten Gating-Schritt wurden dann die PacO-NHS-negativen, lebenden Zellen ausgewählt. Aus den lebenden Einzelzellen wurde in diesem Beispiel folgend die CD45+CD11b+ Monozytenpopulation betrachtet. Diese grundlegende Gating-Strategie wurde bei allen zu untersuchenden Proben angewandt.

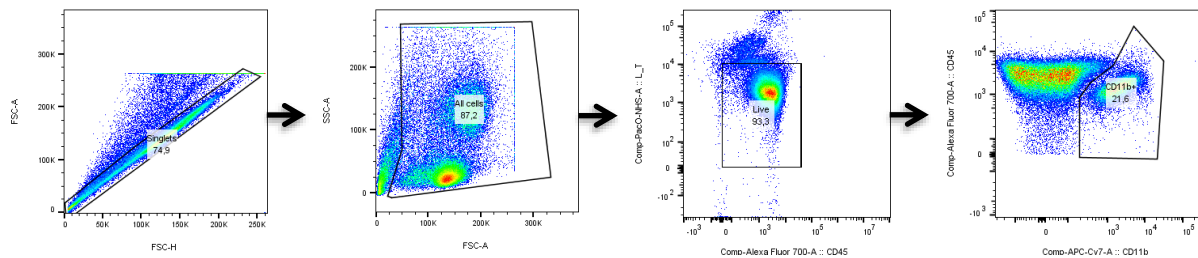


Abb. 7: Exemplarische Darstellung der angewandten Gating-Strategie zur Auswertung durchflusszytometrisch erhobener Daten.

2.2.13 Statistische Auswertung

Die Datenanalyse wurde mit der GraphPad Prism Software Version 9 durchgeführt. Für Zwei-Gruppen-Vergleiche wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-Test verwendet. Für Vergleiche mehrerer Gruppen wurde der One-way ANOVA-Test, gefolgt von Tukey's-multiple-comparisons Test, angewendet. Für Überlebenskurven wurden zwei Gruppen mit dem Logrank (Mantel-Cox-Test) und Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test verglichen. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD angegeben. Signifikanzniveaus sind angegeben als * = $P < .05$, ** = $P < .01$, *** = $P < .001$, **** = $P < .0001$.

3. Ergebnisse

Um die Hypothese zu testen, dass es Interaktionen zwischen dem APAP-Stoffwechsel und der Ahr-Aktivierung gibt, welche die APAP-Toxizität beeinflussen könnten und somit auch die individuelle APAP-Sensibilität, wurden Mäuse einer kombinierten Behandlung mit APAP und nicht-toxischen Ahr-aktivierenden Liganden unterzogen. Dabei wurden Liganden verwendet, die sich in verschiedenen präklinischen Studien für Autoimmunerkrankungen wie Colitis Ulcerosa, Typ-1-Diabetes, Psoriasis oder Multiple Sklerose als vorteilhaft erwiesen haben und perspektivisch in Patienten mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen zur therapeutischen Anwendung gebracht werden könnten.

3.1 Konsequenzen der Ahr-Aktivierung im Modell der APAP-induzierten Leberschädigung

3.1.1 Die Ahr-Aktivierung durch den Liganden ITE induziert eine hyperakute APAP-Hepatotoxizität

Um die Rolle der Ahr-Aktivierung bei der APAP-induzierten Leberschädigung zu untersuchen, wurden Wildtyp-Mäuse zweimal vor der Injektion einer normalerweise subletalen Dosis APAP (350 mg/kg) mit ITE (200 µg) behandelt. Die ITE-Vorbehandlung führte zu einer signifikanten Verschlimmerung der APAP-Hepatotoxizität. Dies zeigte sich durch eine Verschlechterung des allgemeinen Körperzustands im Vergleich zu den mit Vehikel vorbehandelten Kontrollmäusen im Verlauf des Experiments (Abb. 8A, $P < .0001$). Noch auffälliger war, dass die ITE-Vorbehandlung eine unerwartete Mortalität von 80 % innerhalb der ersten 8 Stunden nach der APAP-Behandlung provozierte (Abb. 8B, $P = .0002$), während alle Kontrollmäuse, die vor der APAP-Injektion Vehikel oder kein APAP (nur Vehikel oder ITE) erhielten, überlebten. Darüber hinaus bestätigten die Transaminasenwerte, welche bereits 4 Stunden nach der APAP-Behandlung in den Seren gemessen wurden, eine stark erhöhte Leberschädigung bei Mäusen, die eine kombinierte ITE- und APAP-Behandlung erhielten, im Vergleich zur Behandlung mit Vehikel und APAP (Abb. 8C: ALT, $P = .0002$; 8D: AST, $P < .0001$).

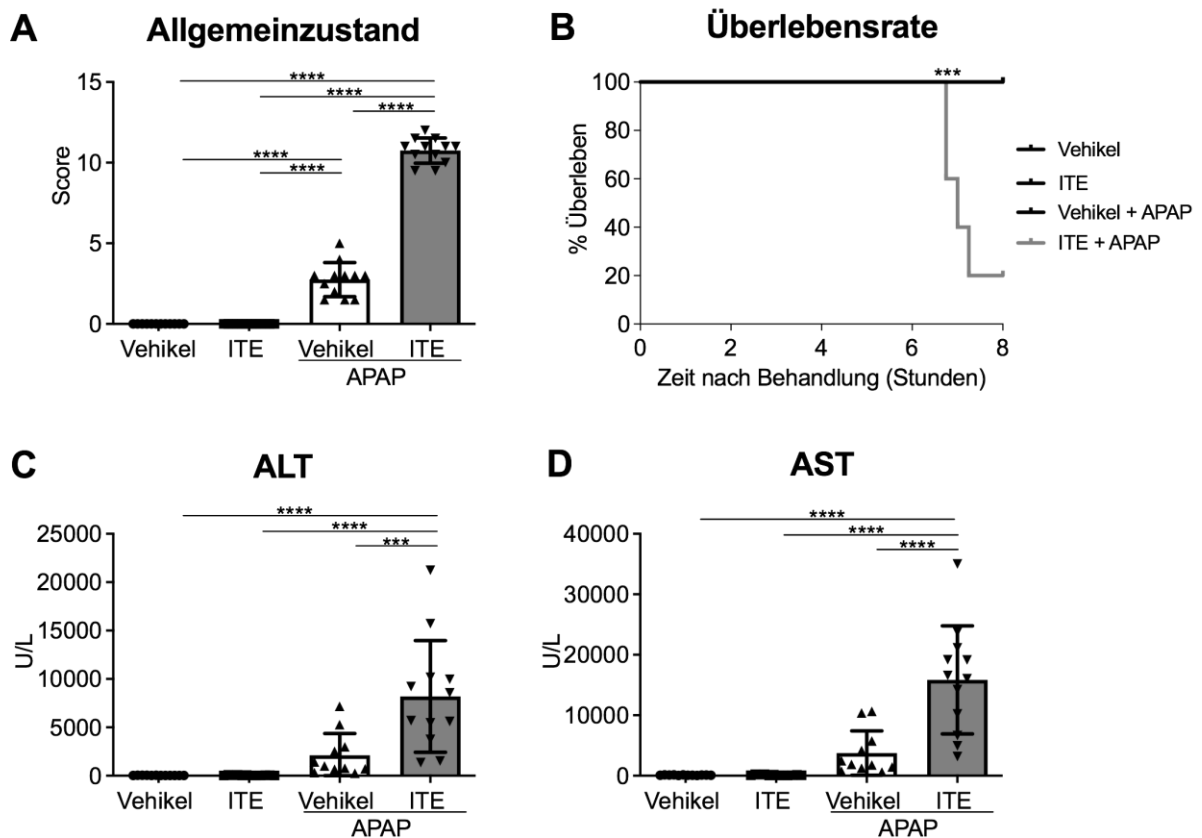


Abb. 8: Die Ahr-Aktivierung durch ITE induziert in Kombination mit APAP eine hyperakute Leberschädigung. Weibliche WT-Mäuse wurden mit Vehikel oder ITE allein, oder mit Vehikel + APAP oder ITE + APAP behandelt (jeweils n=11-12). Die Proben wurden 4 h nach der APAP-Behandlung analysiert und das Überleben wurde 8 h lang beobachtet. **(A)** Krankheits-Score, der den allgemeinen Zustand widerspiegelt, **(B)** Überlebenskurve, **(C+D)** Serum-Lebertransaminasen. ***P < .001, ****P < .0001.

Des Weiteren wurde die Leber histologisch untersucht. Bei Betrachtung der Feinanatomie offenbarte sich in der H&E-Färbung ebenfalls eine drastische Schädigung des Lebergewebes von Mäusen, die mit ITE und APAP behandelt wurden (Abb. 9). Hier ließ sich eine deutliche Zunahme von geschädigten Arealen, welche großflächig perizentral über den Bereich der Zentralvenen hinaus verteilt waren, erkennen (Abb. 9 Areale mit Pfeilen gekennzeichnet).

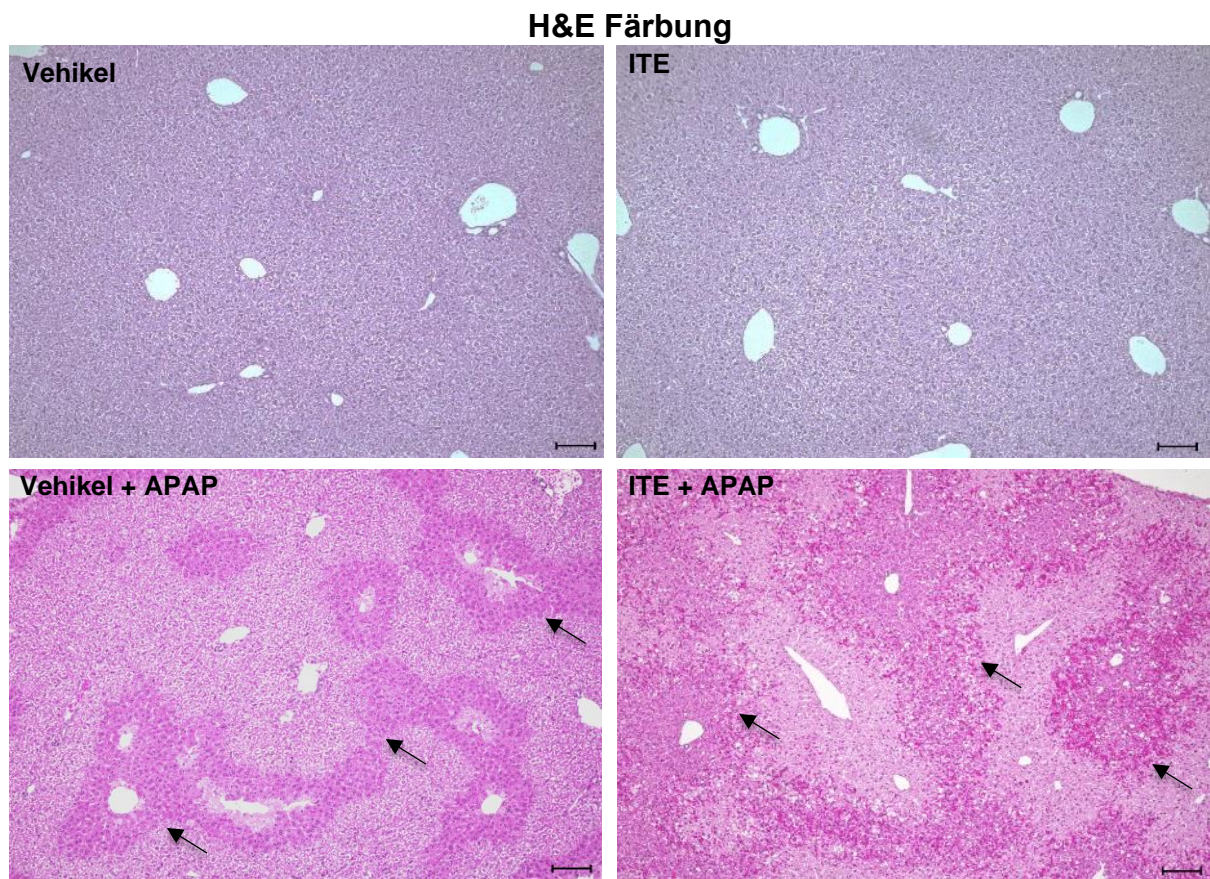
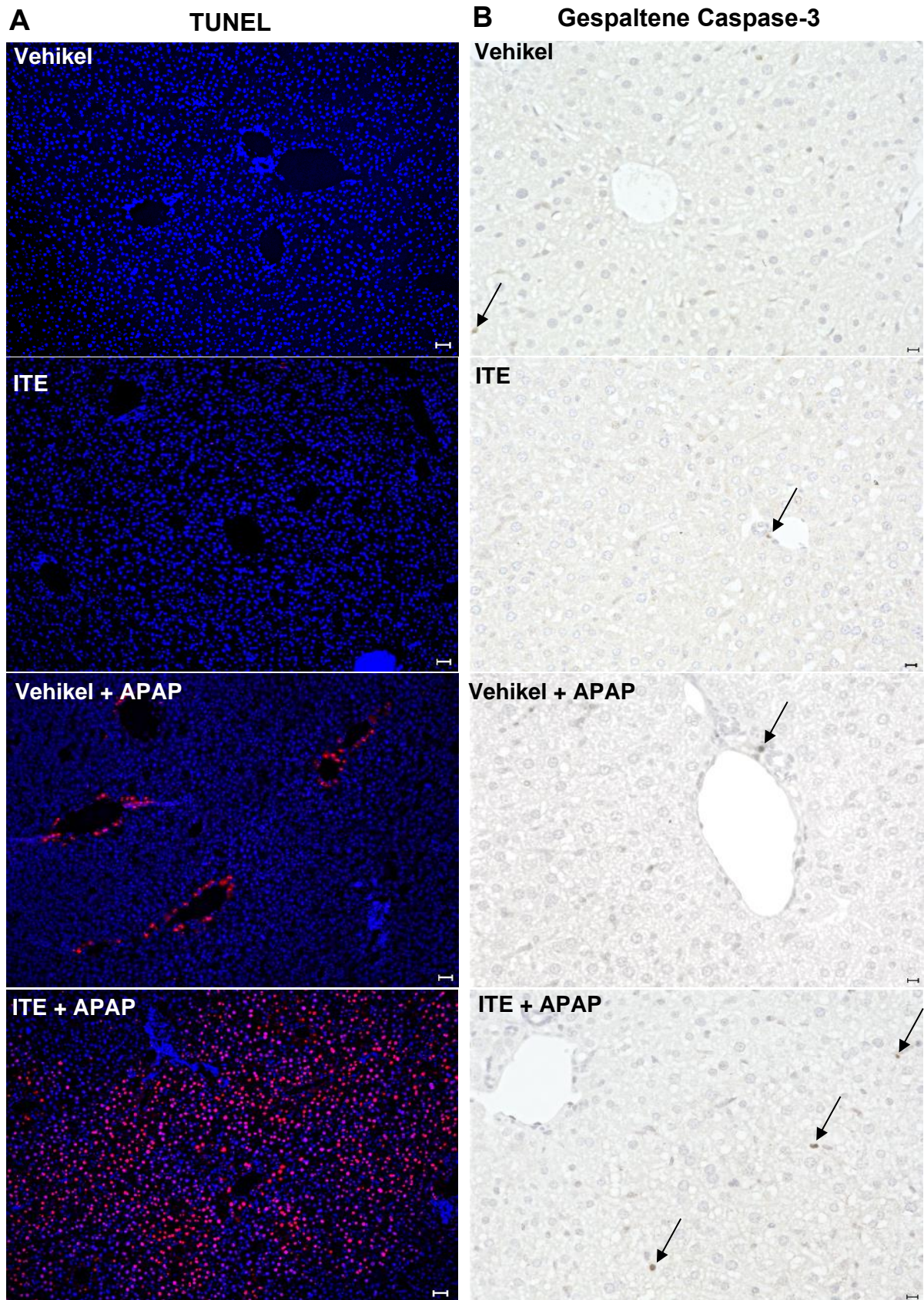


Abb. 9: Betrachtung der Leberschädigung auf feingeweblicher Ebene. Weibliche WT-Mäuse wurden mit Vehikel oder ITE allein, oder mit Vehikel + APAP oder ITE + APAP behandelt und die Proben 4 h nach der APAP-Behandlung gewonnen. H&E-Färbung des Lebergewebes, Maßstab: 100 μ m. Pfeile zeigen geschädigte Areale (Pink) an.

Auch der Nachweis toter Zellen durch die TUNEL-Färbung bestätigte in Lebern von Mäusen, die mit ITE und APAP behandelt wurden, ausgedehnte Bereiche einer hepatozellulären Schädigung (Abb. 10A; 10C, $P = .0001$). Im Gegensatz zu den Kontrolllebern waren diese Bereiche nicht nur auf die Zentralvenen beschränkt. In Anbetracht der nur vereinzelt gespaltener Caspase 3-positiven Zellen (Abb. 10B; 10D, $P = .0036$) handelte es sich dabei hauptsächlich um nekrotische Zellen, da nur wenige apoptotische Zellen detektiert wurden. Beachtlich ist auch, dass bei der alleinigen Behandlung mit ITE ohne APAP-Intoxikation keine Anzeichen einer Leberschädigung beobachtet wurden (Abb. 9; Abb. 10). Die Aktivierung des Ahr durch den nicht-toxischen Liganden ITE hatte also keine negativen Auswirkungen, wenn er allein verabreicht wurde, verschlimmerte aber die APAP-induzierte Leberschädigung erheblich.



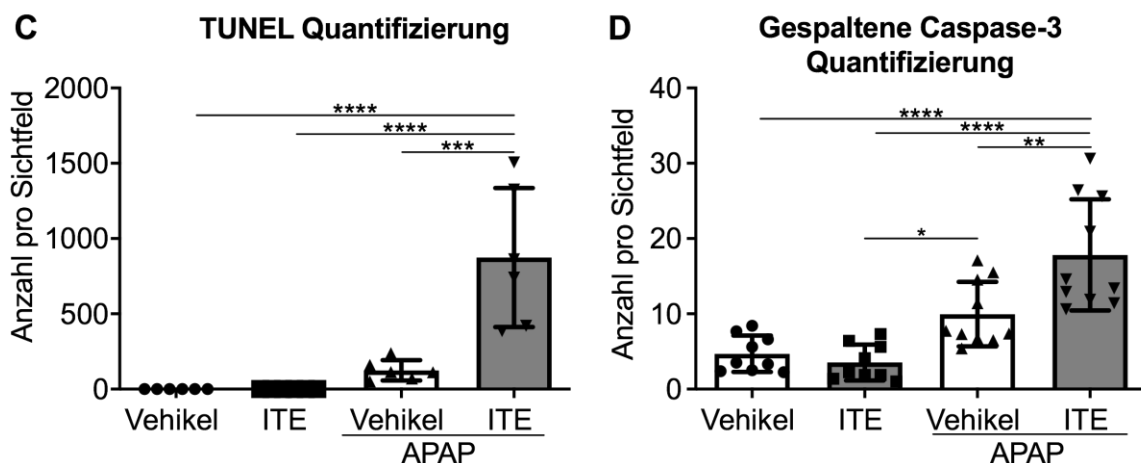
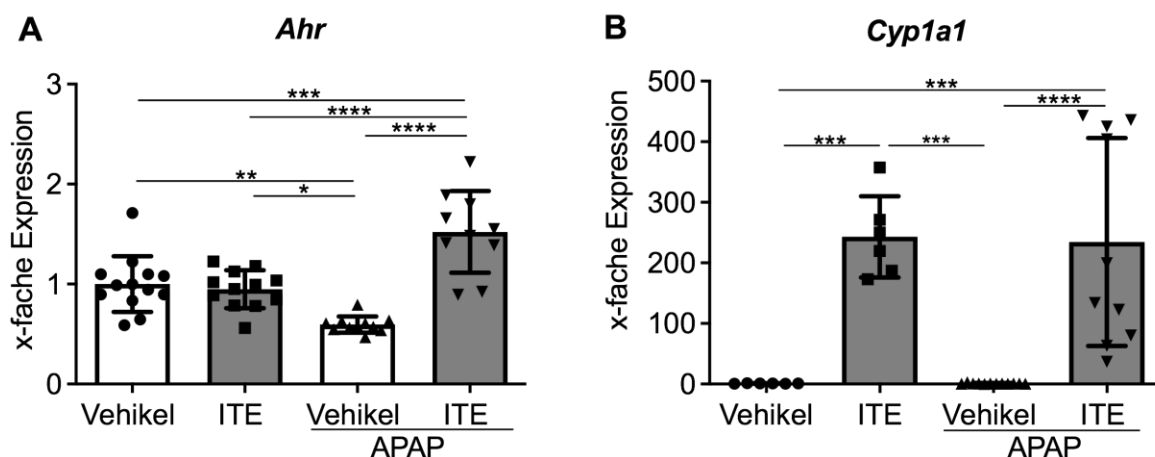


Abb. 10: Zelltod infolge von APAP-Intoxikation und Ahr-Aktivierung durch ITE. Hepatozytenschädigung bewertet durch (A, C) TUNEL-Färbung (rot; Kerne sind blau gefärbt, n=6), (B, D) apoptotische Zellen visualisiert durch gespaltene Caspase-3-Färbung (n=9-10). Maßstabsleiste: 50 μ m. **P < .01, ***P < .001, ****P < .0001.

3.1.2 Eine Ahr-Aktivierung fördert die Akkumulation toxischer APAP-Metabolite

Um die Ahr-abhängigen Mechanismen zu verstehen, die zu einer verstärkten Leberschädigung durch APAP führten, wurde zunächst die hepatische mRNA-Expression von Ahr und Cyp1a1, welches durch den Abbau von Ahr-Liganden die Ahr-Aktivierung limitiert, gemessen, sowie die Expression der wichtigsten APAP-metabolisierenden Enzyme Cyp1a2 und Cyp2e1 quantifiziert. Die Expression aller vier Gene war in ITE- und APAP-behandelten Mäusen im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Kontrollen signifikant hochreguliert (Abb. 11A, *Ahr*: P < .0001; Abb. 11B, *Cyp1a1*: P < .0001; Abb. 11C, *Cyp1a2*: P < .0001; Abb. 11D, *Cyp2e1*: P < .0001). Die direkt nachgeschalteten Ziele des Ahr, Cyp1a1 und Cyp1a2, wurden entsprechend auch durch die alleinige ITE-Ligation aktiviert (Abb. 11B, *Cyp1a1*: P = .0010; Abb. 11C, *Cyp1a2*: P < .0001).



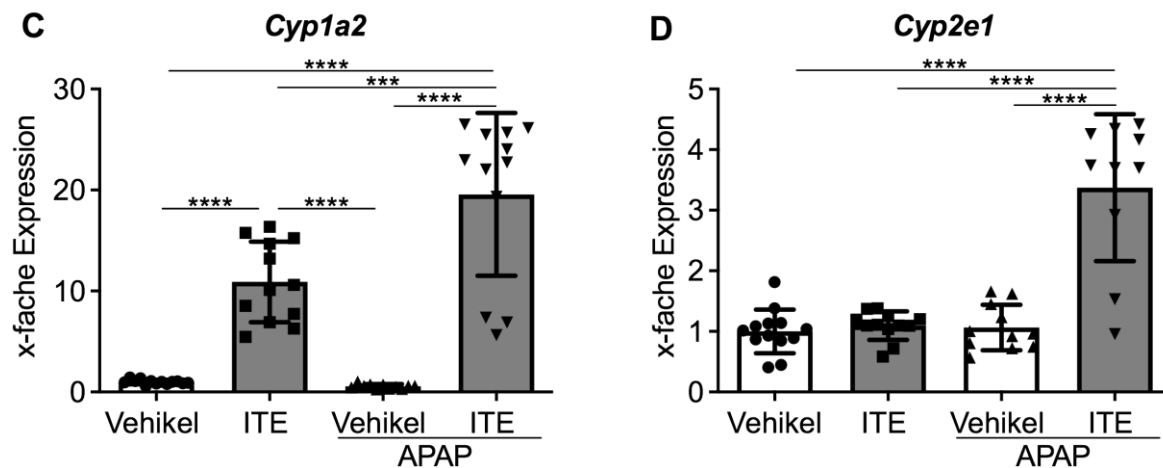
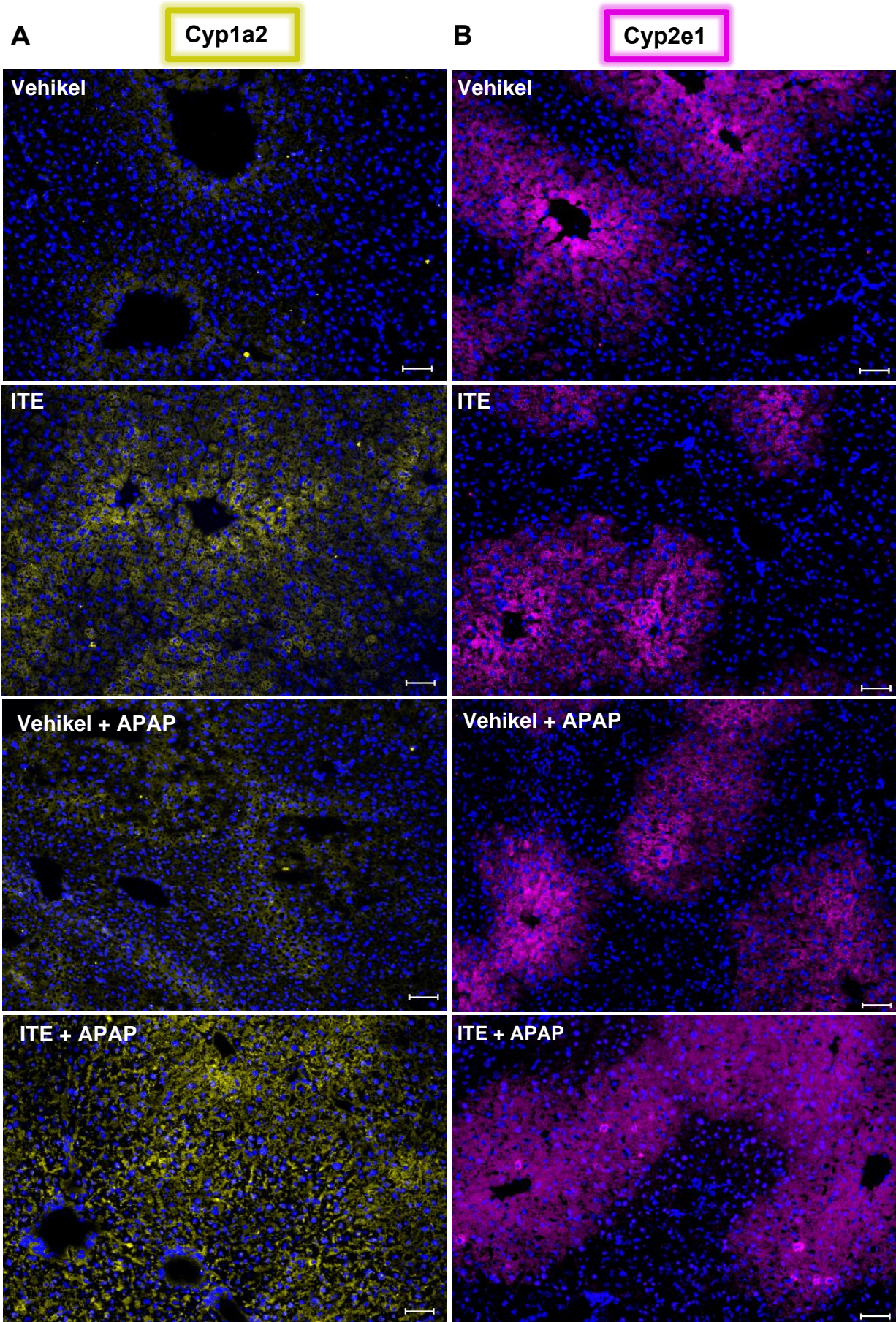


Abb. 11: Hepatische RNA-Expression von Ahr und den APAP-metabolisierenden Enzymen Cyp1a1, Cyp1a2 und Cyp2e1. Weibliche WT-Mäuse wurden mit Vehikel oder ITE allein, oder mit Vehikel + APAP oder ITE + APAP behandelt (n=6-13). Die hepatische Genexpression von **(A) Ahr**, **(B) Cyp1a1**, **(C) Cyp1a2** und **(D) Cyp2e1** wurde 4 h nach APAP-Behandlung analysiert. Die Zielgenexpression ist als x-fache Expression im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle dargestellt. *P < .05, **P < .01, ***P < .001, ****P < .0001.

Zusätzlich wurden die beiden APAP-metabolisierenden Enzyme Cyp1a2 und Cyp2e1 auf Proteinebene gemessen. Die Vermutung liegt nahe, dass die Ahr-Cyp1a2-Achse das wichtigste mechanistische Bindeglied ist, das für die Ahr-abhängige Verschlimmerung der APAP-induzierten Leberschädigung verantwortlich ist. Die Immunfluoreszenzfärbung zeigte für die Cyp1a2-Expression sowohl bei ITE als auch bei mit APAP kombiniert behandelten Mäusen eine eindeutig ausgedehnte perizentrale Zonierung der Leber, während die Cyp2e1-Expression in allen Gruppen eine ähnliche perizentrale Zonierung aufwies, wenn auch etwas verstärkt in ITE- und APAP-behandelten Mäusen (Abb. 12A; 12B). Anhand von Immunfluoreszenzfärbung (Abb. 12A; 12B) und Immunoblotting (Abb. 12C; 12D; 12E) wurde festgestellt, dass Cyp1a2 (12D, Cyp1a2: P = .0002), aber nicht Cyp2e1 (12E, Cyp2e1: P = .9988), nach kombinierter ITE- und APAP-Behandlung signifikant um ein Vielfaches erhöht war. Dabei ist besonders von Bedeutung, dass die Expression des direkten Ahr-Zielgens Cyp1a2 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene ebenfalls hochreguliert war, wenn ITE allein ohne APAP verabreicht wurde (Abb. 11C, Cyp1a2: P < .0001; 12A; 12C; 12D, Cyp1a2: P < .0001). Dieses Phänomen konnte für Cyp2e1 nicht beobachtet werden, welches im Gegensatz zu Cyp1a2 auch kein direktes nachgeschaltetes Ziel von Ahr darstellt (Abb. 11D, Cyp2e1: P = .9812; 12B; 12C; 12E, Cyp2e1: P = .9501).



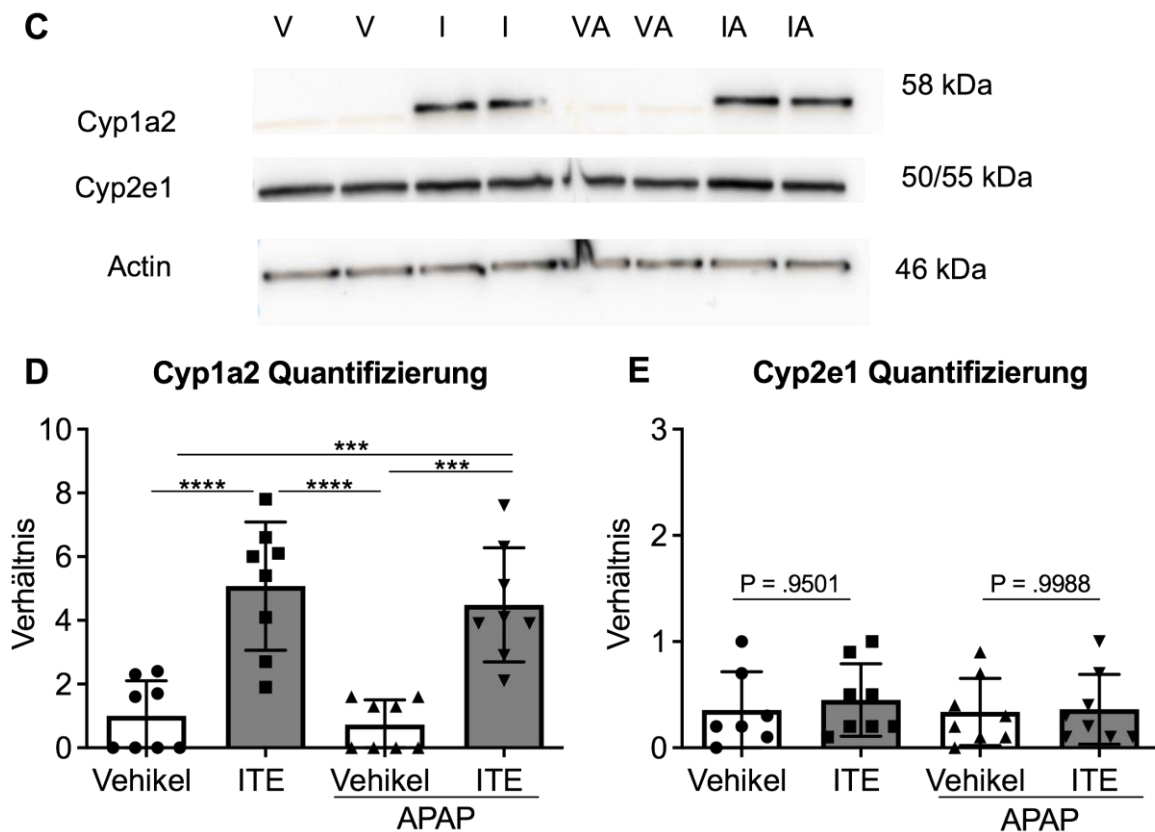


Abb. 12: Analyse von Cyp1a2 und Cyp2e1 auf Proteinebene. Repräsentative Färbung der hepatischen Proteinexpression von **(A)** Cyp1a2 (gelb) und **(B)** Cyp2e1 (lila). Die Zellkerne sind blau gefärbt. Maßstabsleiste: 50 μ m. **(C, D, E)** Western Blot Analyse und Quantifizierung der relativen Cyp1a2- und Cyp2e1-Proteinmenge (V= Vehikel, I = ITE, VA = Vehikel + APAP, IA = ITE + APAP, n=7-8). ***P < .001, ****P < .0001.

Bei der Analyse von APAP-Metaboliten und -Addukten, welche entsprechend nach Sezgin et al. [66] 30 Minuten nach der Behandlung gemessen wurden, zeigte sich zunächst im Rahmen der hepatischen Phase-II-Reaktion kein signifikanter Unterschied zwischen den ITE- und Vehikel-behandelten Mäusen im APAP-Abbau in Verbindung mit den Sulfotransferasen (Abb. 13A, APAP-SUL: P = .4242). Für die Verbindung mit Glucuronosyltransferasen zeigten sich hingegen signifikant erhöhte nicht-toxische APAP-GLC-Metabolite in ITE-vorbehandelten Mäusen (Abb. 13B, APAP-GLC: P= .0015). Zusätzlich wurde festgestellt, dass der Gesamt-GSH-Spiegel in ITE-behandelten Mäusen nach einer APAP-Intoxikation im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle signifikant niedriger war (Abb. 13C, Gesamt-GSH: P = .0005). Bei Betrachtung des Phase-I-Metabolismus, in dem durch die Cyp-Enzyme toxische APAP-Metaboliten entstehen, zeigte sich eine signifikante Erhöhung der bekannten toxischen Addukte APAP-GSH (Abb. 13D, P < .0001), APAP-CYS (Abb. 13E, P = .0010) und APAP-NAC (Abb. 13F, P = .0006). Somit schien eine ITE-

Vorbehandlung die APAP-induzierte Leberschädigung zu verschlimmern, indem sie über das Phase-I-Enzym Cyp1a2 eine toxische NAPQI-Bildung förderte und dessen GSH-abhängigen Abbau verminderte, was sich durch die signifikant erhöhte Akkumulation von gemessenen toxischen APAP-Addukten widerspiegelt.

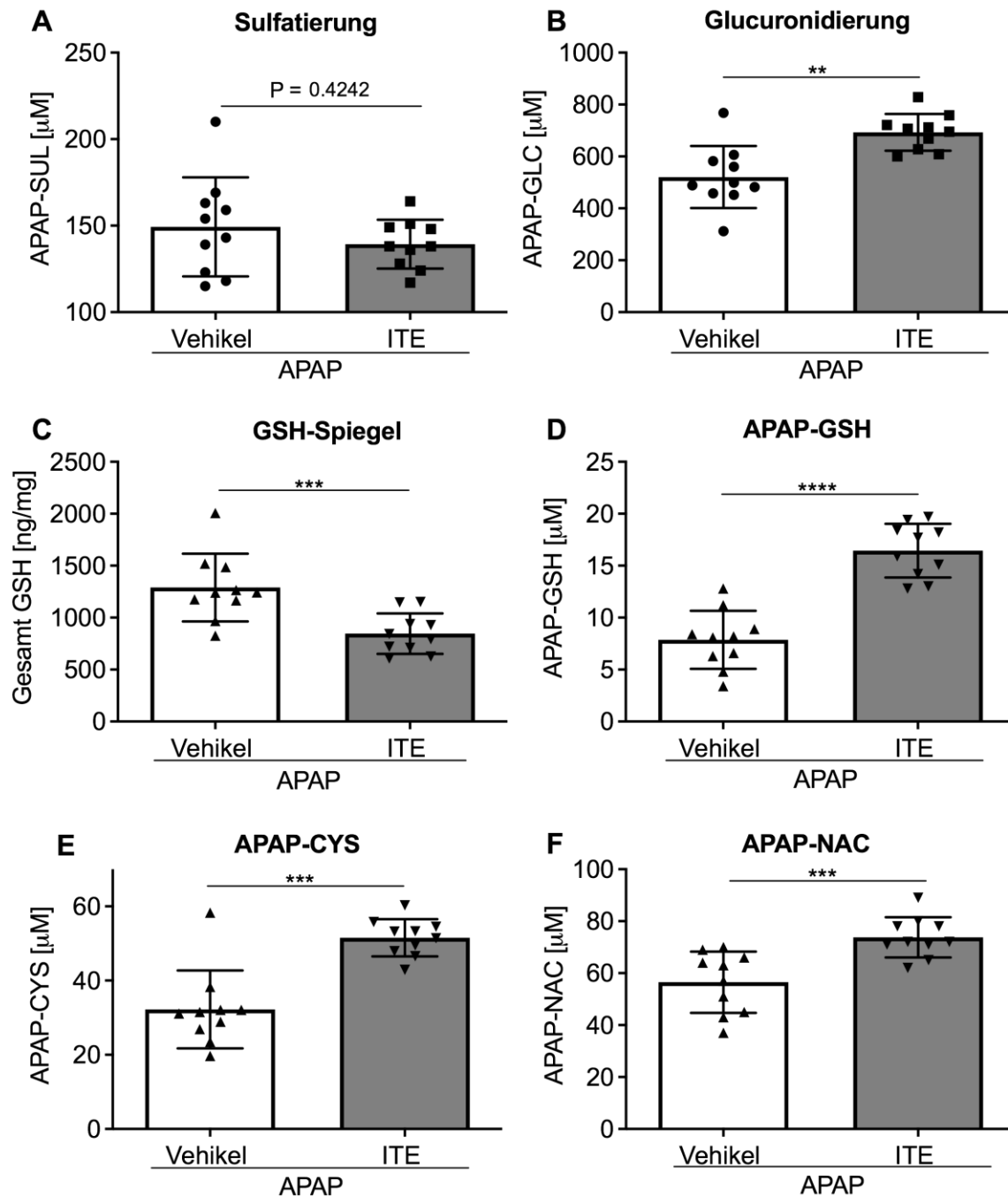


Abb. 13: APAP-Metabolisierung. APAP-Abbau der Phase-II über (A) Sulfotransferasen und (B) Glucuronosyltransferasen im Plasma sowie (C) der Gesamt-GSH-Spiegel im Lebergewebe und (D, E, F) toxische APAP-Addukte der Phase-I im Plasma 30 min nach APAP-Behandlung (n=10). **P < .01, ***P < .001, ****P < .0001.

3.1.3 Die Ahr-vermittelte hyperakute APAP-Hepatotoxizität ist mit einer erhöhten Entzündungsreaktion verbunden

Die Schwere der APAP-induzierten Leberschädigung hängt laut Literatur entscheidend von der Infiltration entzündlicher Zellen wie Monozyten und Neutrophilen ab [25, 87]. Daher wurde als nächstes analysiert, ob diese Zellpopulationen an der Verschlimmerung der APAP-induzierten Leberschädigung nach Ahr-Aktivierung beteiligt sind. Tatsächlich wurde auf mRNA-Ebene eine Hochregulierung der inflammatorischen Monozyten- und Neutrophilenmarker *Itgam* (CD11b), *Ly6c1* und *Ly6g* in den Lebern der mit ITE und APAP behandelten Mäuse im Vergleich zu den mit Vehikel und APAP behandelten Kontrollen (Abb. 14A, *Itgam*: $P < .0001$; 14B, *Ly6c1*: $P = .0008$; 14C, *Ly6g*: $P < .0001$) gefunden.

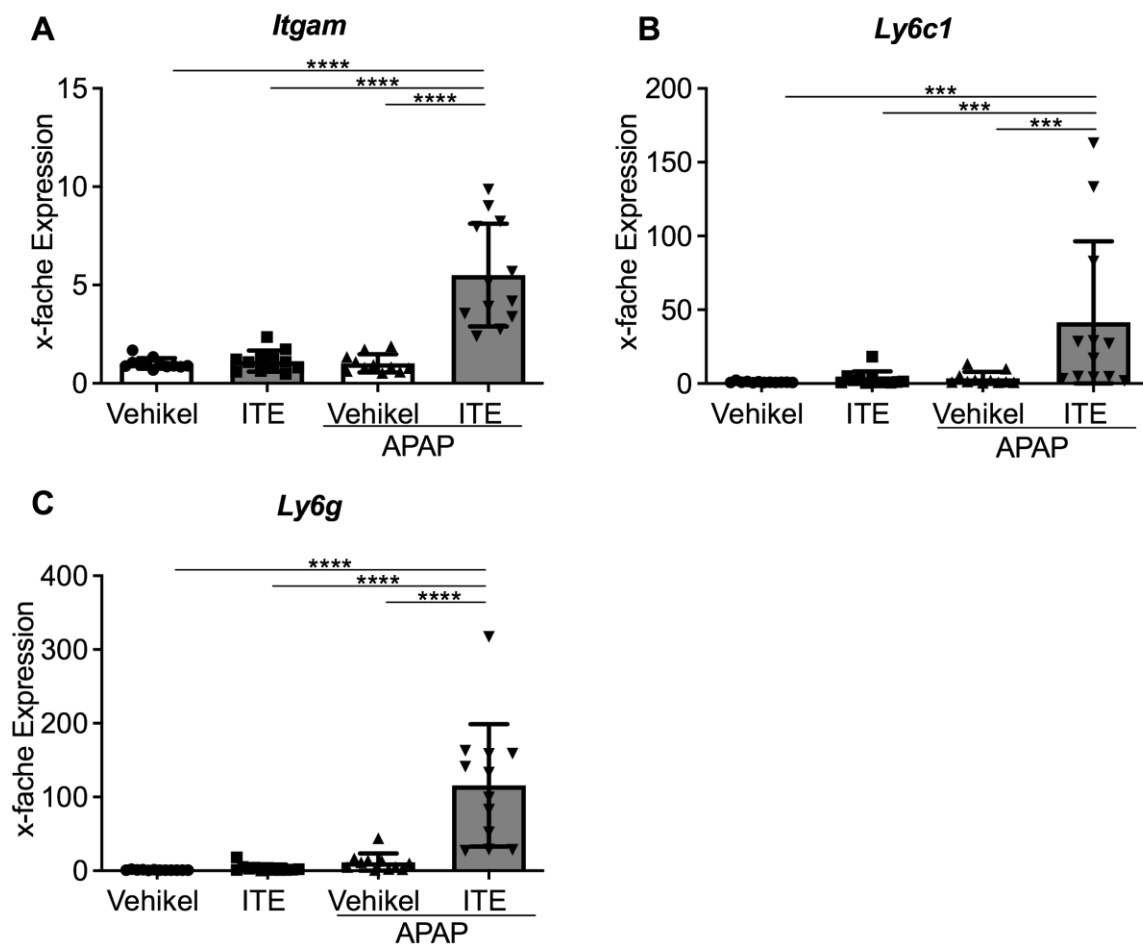
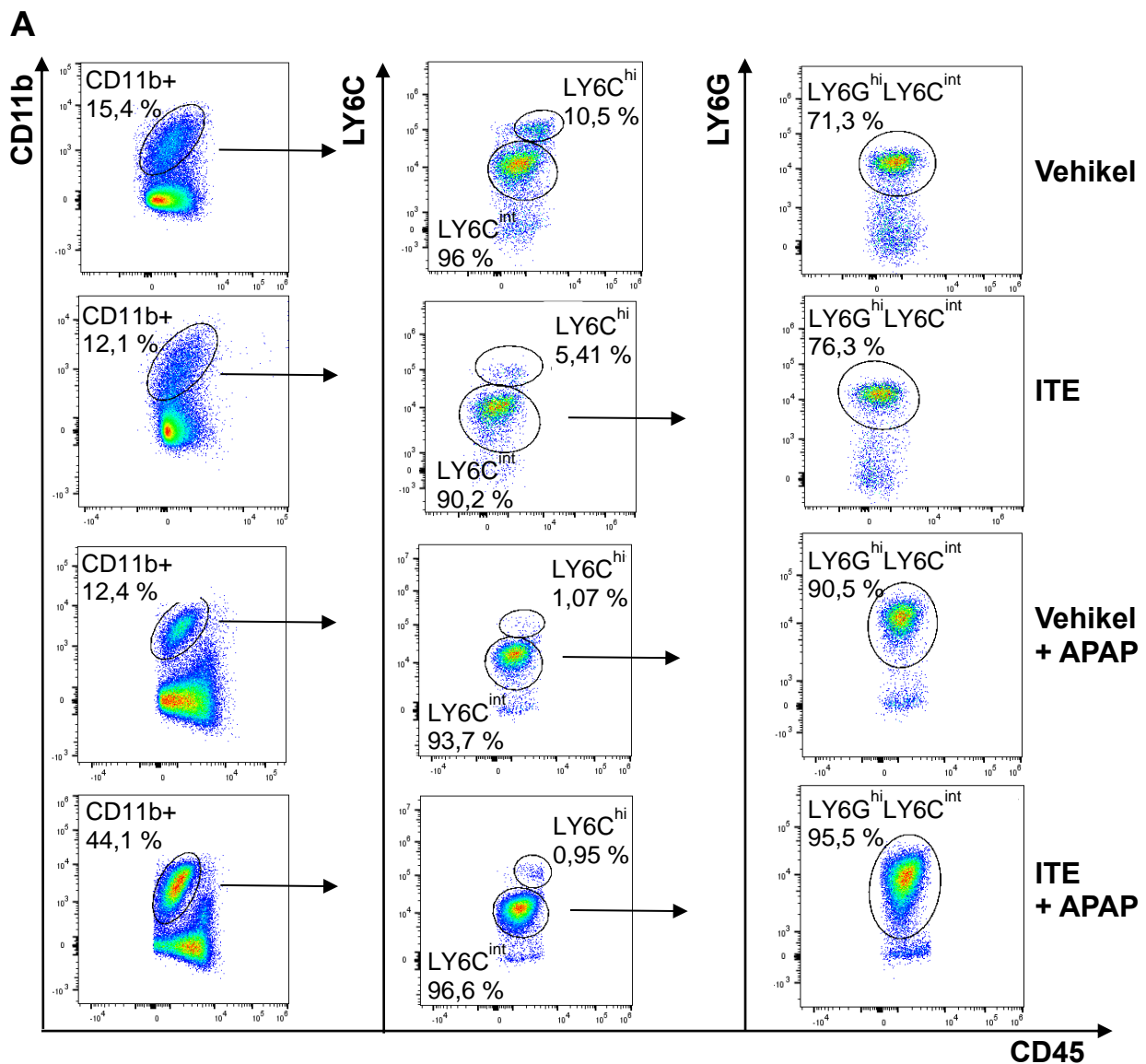


Abb. 14: Hepatische Genexpression von Monozyten- und Neutrophilen-Markern. Weibliche WT-Mäuse wurden mit Vehikel oder ITE allein, oder mit Vehikel + APAP oder ITE + APAP behandelt (jeweils $n=11-12$). Die hepatische Genexpression von **(A)** *Itgam* (DCs, Makrophagen, Monozyten, Granulozyten) **(B)** *Ly6c1* (Monozyten) und **(C)** *Ly6g* (Neutrophile) wurde 4 h nach APAP-Behandlung analysiert. Die Zielgenexpression ist als x-fache Expression im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle dargestellt. *** $P < .001$, **** $P < .0001$.

Um die Infiltration von Entzündungszellen zudem auf zellulärer Ebene zu charakterisieren, wurden nicht-parenchymale Zellen aus Lebern isoliert und mittels Durchflusszytometrie betrachtet. Entsprechend der zuvor beobachteten signifikant erhöhten Expression der inflammatorischen Monozyten- und Neutrophilenmarker bestätigte auch die Durchflusszytometrie eine erhöhte hepatische Akkumulation von CD11b+ myeloiden Zellen in den zuvor mit ITE und APAP behandelten Mäusen im Vergleich zu den mit Vehikel und APAP behandelten Kontrollen (Abb. 15A; 15B, CD11b+Zellen: $P = .0002$). Davon waren innerhalb dieser Zellpopulation die Mehrheit LY6C^{int}LY6C^{hi} Neutrophile (Abb. 15D, $P = .0001$). Die CD11b+LY6C^{hi} entzündlichen Monozyten waren im Vergleich zu den Kontrollen jedoch nicht signifikant erhöht (Abb. 15C, $P = .0935$).



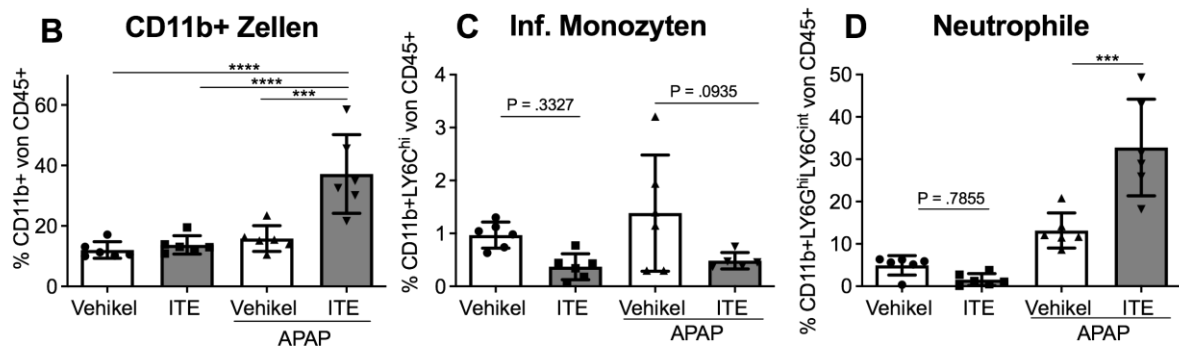
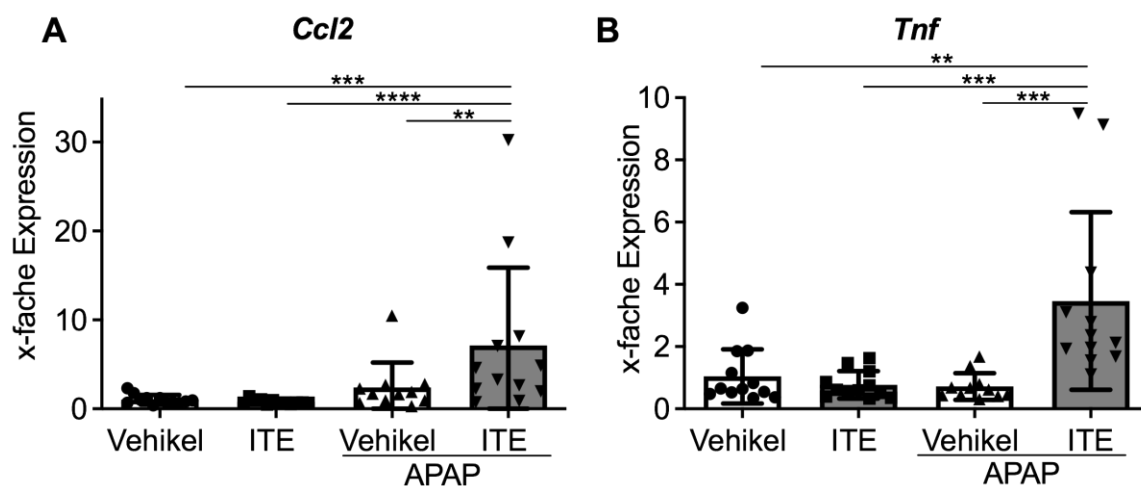


Abb. 15: Durchflusszytometrische Analyse der leberinfiltrierenden CD11b+ LY6^{Ch} Monozyten und CD11b+LY6G^{hi}LY6C^{int} Neutrophilen. Weibliche WT-Mäuse wurden mit Vehikel oder ITE allein, oder mit Vehikel + APAP oder ITE + APAP behandelt (jeweils n=5-6). Die exemplarische Darstellung der Zellpopulationen (A) und statistische Analyse zeigt die (B) CD11b+ Zellen sowie davon (C) inflammatorischen Monozyten und (D) Neutrophilen 4 h nach APAP-Behandlung. ***P < .001, ****P < .0001.

Passend zu der erhöhten Infiltration von Neutrophilen wurden auch signifikant erhöhte Spiegel des Chemokins *Ccl2* (Monozyten chemotaktisches Protein 1) (Abb. 16A, P = .0054) sowie eine erhöhte Expression der inflammatorischen Zytokine *Tnf* (Abb. 16B, P = .0006), *Il6* (Abb. 16C, P = .0002), *Il18* (Abb. 16D, P > .0001) und *Il1b* (Abb. 16E, P > .0001) gemessen. Dabei wiesen die Kontrollmäuse, welche nur Vehikel oder ITE ohne zusätzliche APAP-Intoxikation erhielten, weder auf zellulärer noch auf molekularer Ebene Anzeichen einer Leberentzündung auf (Abb. 14, 15, 16). Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die Verstärkung der APAP-induzierten Leberschädigung nach der Ahr-Aktivierung durch ITE mit einer verstärkten hepatischen Infiltration von Entzündungszellen, insbesondere von Neutrophilen, und einer erhöhten Entzündungsreaktion verbunden war.



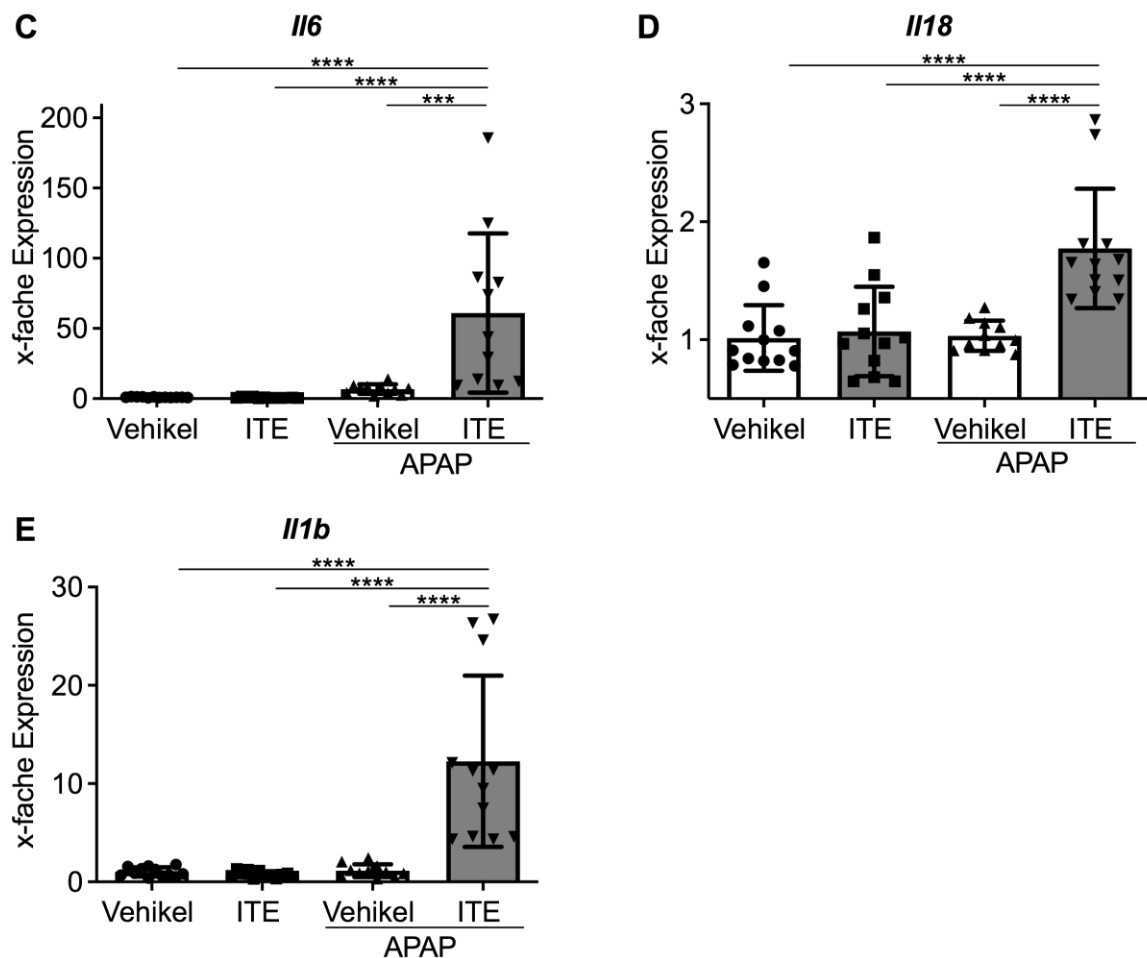
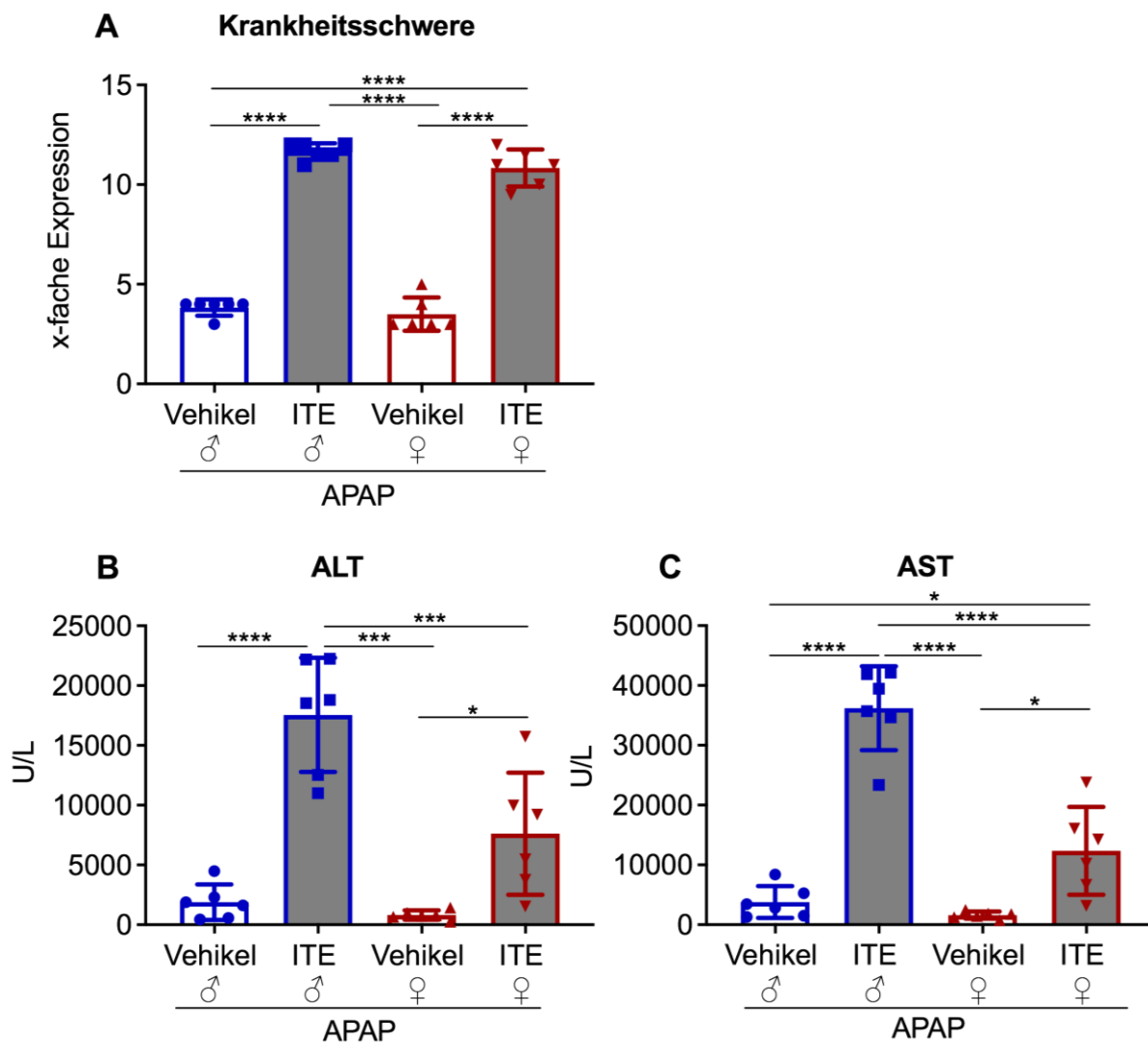


Abb. 16: Hepatische Genexpression von Entzündungsmediatoren. Weibliche WT-Mäuse wurden mit Vehikel oder ITE allein, oder mit Vehikel + APAP oder ITE + APAP behandelt (jeweils n=11-12). Die hepatische Genexpression von **(A)** *Ccl2*, **(B)** *Tnf*, **(C)** *Il6*, **(D)** *Il18* und **(E)** *Il1b* wurde 4 h nach APAP-Behandlung analysiert. Die Zielgenexpression ist als x-fache Expression im Vergleich zur Vehikel Kontrolle dargestellt. **P < .01, ***P < .001, ****P < .0001.

3.1.4 Die Ahr-vermittelte hyperakute APAP-Hepatotoxizität ist geschlechtsunabhängig

Da geschlechtsspezifische Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber APAP beschrieben wurden, stellte sich die Frage, ob die beobachtete Überempfindlichkeit gegenüber APAP als Reaktion auf die Ahr-Aktivierung geschlechtsabhängig ist. In Übereinstimmung mit der Literatur [138, 139, 231, 232] zeigten männliche Mäuse im Vergleich zu weiblichen Mäusen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber APAP, was durch eine höhere Leberschädigung anhand der Serumtransaminasen ALT und AST nach der Behandlung mit ITE + APAP angezeigt wurde (Abb. 17B, 17C). So lag der Wert der ALT im Mittel für Männchen bei 17551,5 U/L im Vergleich zu 7615,56 U/L bei Weibchen (Abb. 17B) und der AST-Wert für Männchen bei 36213,5 U/L verglichen mit 12353 U/L

bei Weibchen (Abb. 17C). In Anbetracht der in dieser Arbeit entdeckten Reaktion auf die ITE-Behandlung und der daraus resultierenden verstärkten APAP-Hepatotoxizität lässt sich jedoch bei beiden Geschlechtern ein ähnlich verheerender Effekt beobachten. Dieser spiegelte sich sowohl in Männchen als auch in Weibchen durch einen insgesamt signifikanten Anstieg der Krankheitsschwere (Abb. 17A, jeweils $P > .0001$), der Serumtransaminasen (Abb. 17B, ALT: $P = .0001$ (♂), $P = .0175$ (♀); 17C, AST: $P = .0001$ (♂), $P = .0101$ (♀)) und der Induktion der APAP-metabolisierenden Enzyme *Cyp1a2* (Abb. 17D, $P = .003$ (♂), $P = .0001$ (♀)) und *Cyp2e1* (Abb. 17E, $P = .0001$ (♂), $P = .1507$ (♀)) wider. Somit tritt die beschriebene hyperakute APAP-induzierte Hepatotoxizität als Reaktion auf die Ahr-Aktivierung bei beiden Geschlechtern in ähnlichem Maße auf.



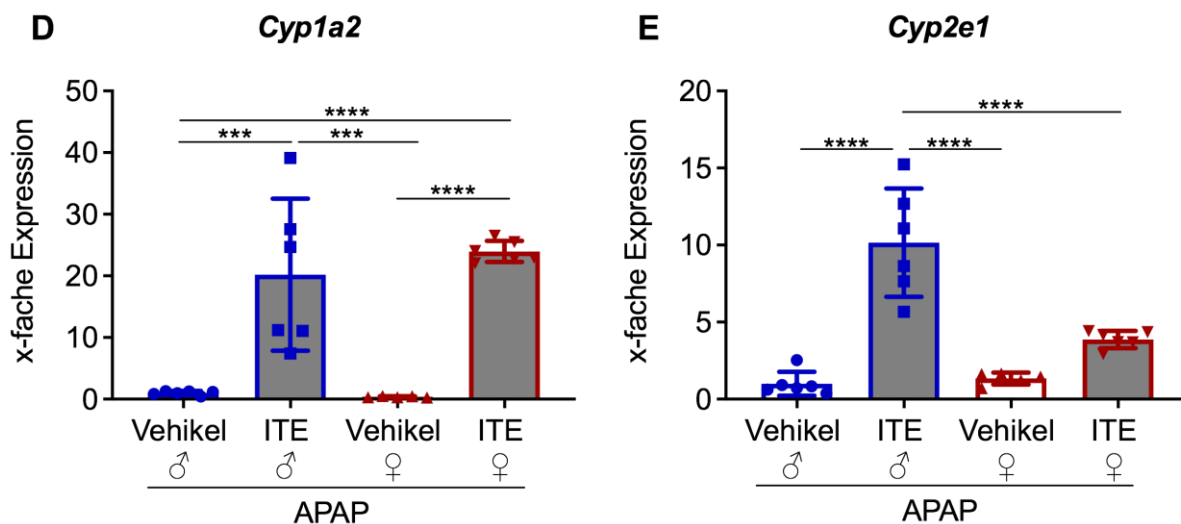


Abb. 17: Der ITE-vermittelte hyperakute Verlauf der APAP-induzierten Leberschädigung ist bei beiden Geschlechtern ähnlich. Männliche (blau) oder weibliche (rot) C57Bl/6-Mäuse (jeweils n=5-6) wurden i.p. mit 200 µg ITE oder Vehikel an zwei aufeinanderfolgenden Tagen vor der i.p. Injektion von 350 mg/kg APAP behandelt. **(A)** Krankheitsschwere, **(B)** ALT- und **(C)** AST-Serumspiegel sowie die Genexpression von **(D)** *Cyp1a2* und **(E)** *Cyp2e1* wurden analysiert. *P < .05, ***P < .001, ****P < .0001.

3.1.5 Die ITE-vermittelte Ahr-Aktivierung in myeloischen Zellen verschlimmert die Acetaminophen-induzierte Leberschädigung nicht

Als ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor wird Ahr konstitutiv sowohl in myeloischen Zellen, einschließlich Neutrophilen, als auch in Hepatozyten exprimiert. Da all diese Zelltypen an der APAP-vermittelten Leberschädigung beteiligt sind, wurde auf zellulärer Ebene weiter untersucht, inwiefern die Ahr-Aktivierung zur APAP-induzierten Leberschädigung beiträgt. Zu diesem Zweck wurden konditionale Ahr-KO-Mäuse, denen die Ahr-Expression in myeloischen Zellen ($LysM^{\Delta/Ahr}$), einschließlich Makrophagen, Monozyten und Granulozyten fehlt, verwendet. Dies wurde durch eine qPCR-Analyse der *Ahr*-mRNA-Expression in isolierten F4/80+ Lebermakrophagen bestätigt (Abb. 18A, P = .0317). Um zu adressieren, ob der Ahr-KO in myeloischen Zellen per se schon einen Einfluss auf die APAP-induzierte Leberschädigung hat, wurde $LysM^{\Delta/Ahr}$ -Mäusen und ihren Wurfgeschwistern mit funktionellem Ahr in einem Experiment APAP verabreicht. Interessanterweise konnten nach 8 Stunden hier keine signifikanten Unterschiede in der Leberschädigung anhand der Serumtransaminasen ALT (Abb. 18B, P = .5887) und AST (Abb. 18C, P = .9372) zwischen $LysM^{\Delta/Ahr}$ -Mäusen im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern beobachtet werden.

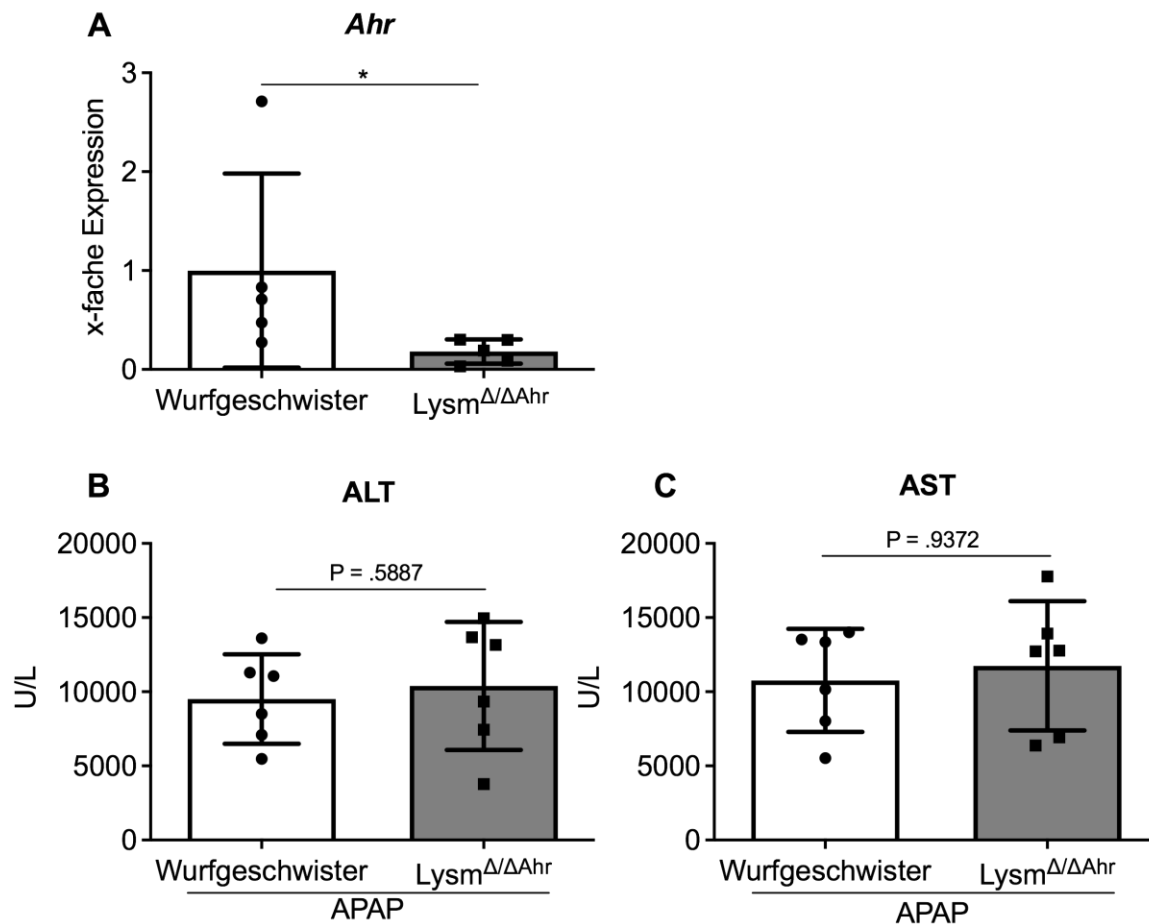


Abb. 18: Kein Einfluss von *Ahr* in myeloischen Zellen auf die APAP-Hepatotoxizität. (A) qPCR-basierter Nachweis des effizienten *Ahr*-Knockdowns in myeloischen Zellen, die aus Lebern weiblicher $LysM^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Mäuse isoliert wurden, im Vergleich zu Wurfgeschwisterkontrollen mit funktionellem *Ahr* in myeloischen Zellen (jeweils $n=5$). (B) ALT- und (C) AST-Serumspiegel von weiblichen $LysM^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Mäusen oder deren Wurfgeschwistern 8 h nach APAP-Behandlung (jeweils $n=6$). * $P < .05$.

Anschließend wurden die $LysM^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Mäuse und ihre Wurfgeschwister, wie schon in 3.1.1 beschrieben, einer kombinierten ITE- und APAP-Behandlung unterzogen und nach 4 Stunden analysiert. Auch hier blieb der Schweregrad der Erkrankung zwischen beiden Gruppen vergleichbar, was sich durch eine ähnliche allgemeine Krankheitsschwere (Abb. 19A, $P = .8848$) und vergleichbare Serumtransaminasenwerte von ALT (Abb. 19B, $P = .7675$) und AST (Abb. 19C, $P > .9999$) zeigte.

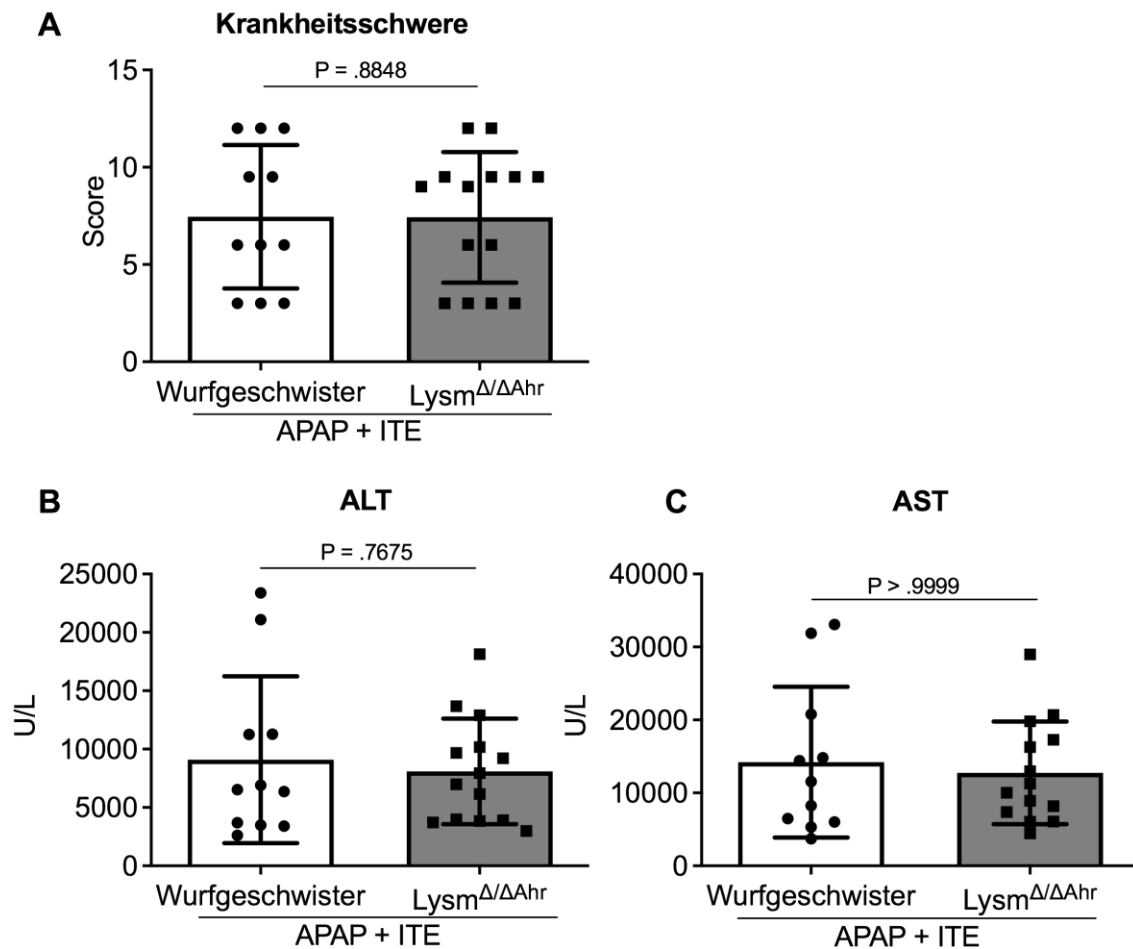
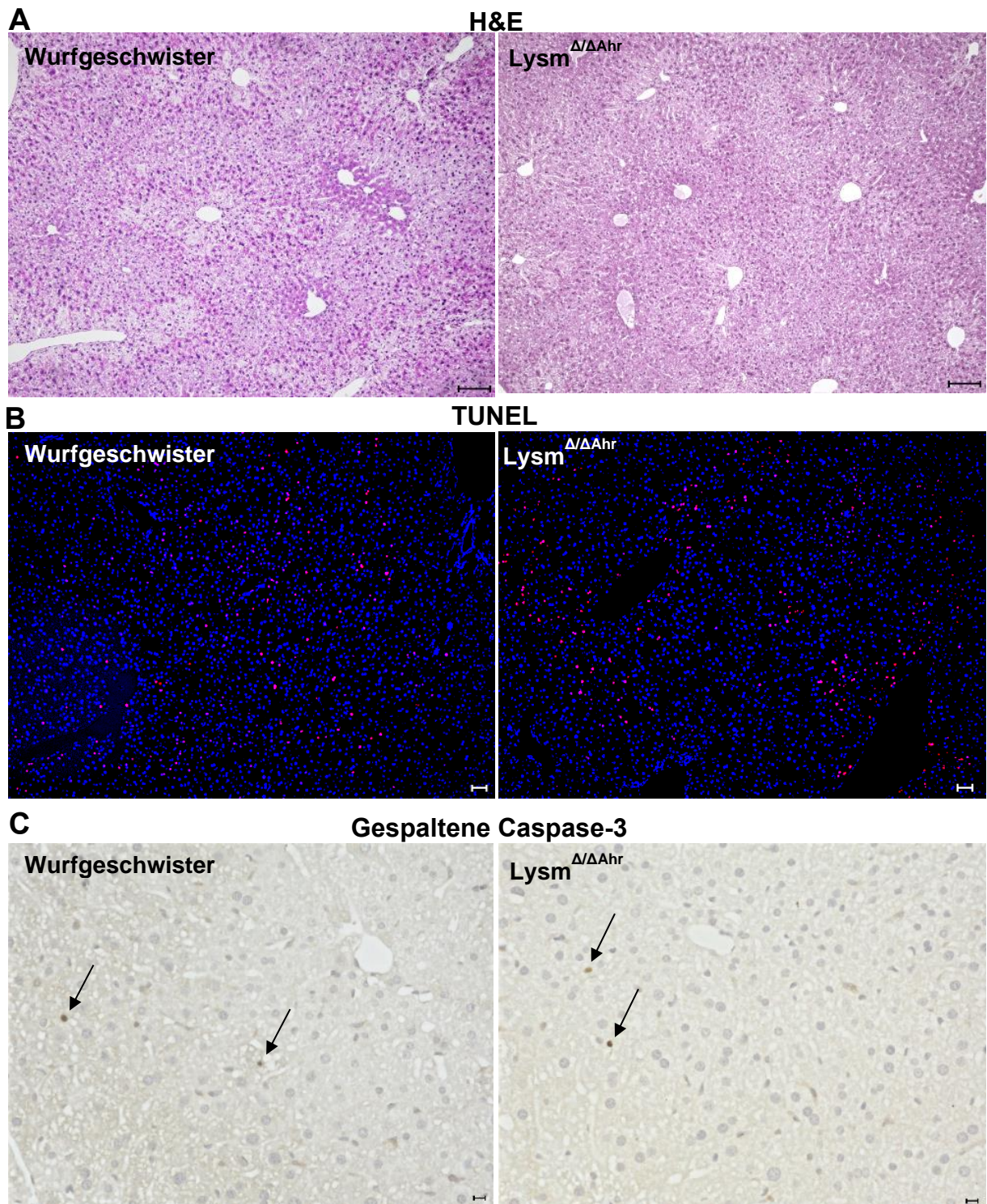


Abb. 19: Keine Relevanz der ITE-vermittelten Ahr-Aktivierung in myeloischen Zellen für den Verlauf der Acetaminophen-induzierten Leberschädigung. Männliche LysM Δ/Δ Ahr-Mäuse (n=14) oder Wurfgeschwisterkontrollen (n=11) wurden mit ITE + APAP behandelt und 4 h nach der APAP-Behandlung analysiert. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in **(A)** Krankheitsschwere und den Serumtransaminasen **(B)** ALT sowie **(C)** AST gefunden.

Die Leberhistologie zeigte ein ähnliches Bild. Es ließen sich weder in der H&E-Färbung (Abb. 20A) noch in der gespaltenen Caspase-3-Färbung (Abb. 20C, 20E, P = .5097) signifikante Unterschiede hinsichtlich der hepatozellulären Schädigung in Form von Apoptose und Nekrose zwischen den beiden Gruppen erkennen, während die TUNEL-Färbung (Abb. 20B, 20D, P = .0823) eine Tendenz für erhöhte Zellschädigung in LysM Δ/Δ Ahr-Mäusen zeigte.



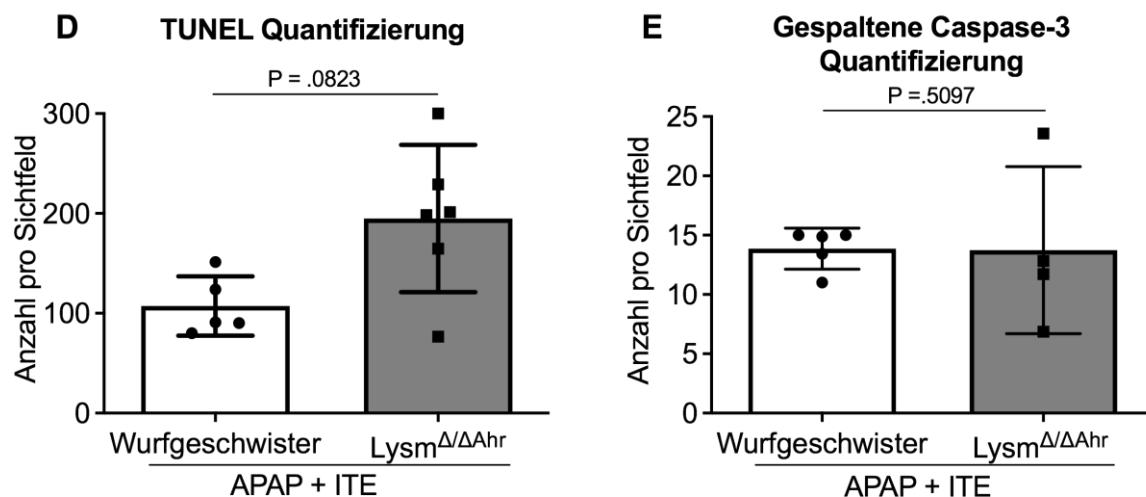


Abb. 20: Äquivalente Gewebeschäden in LysM Δ/Δ Ahr-Mäusen und ihren Wurfgeschwistern nach Ahr-Aktivierung und APAP-Intoxikation. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Gewebeschädigung anhand der (A) H&E-Färbung (Maßstabsbalken: 100 μ m) festgestellt. Die (B, D) TUNEL-Färbung (rot, Kerne sind blau gefärbt; n=5-6; Maßstabsbalken: 50 μ m) sowie (C, E) die Analyse von gespaltener Caspase-3 (Maßstabsbalken: 50 μ m) als Indikatoren von Zelltod und Apoptose zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (n=4-5).

Zudem wurde, wie schon in 3.1.3 dargestellt, auch hier die hepatische Genexpression inflammatorischer Marker untersucht. In LysM Δ/Δ Ahr-Mäusen und ihren Wurfgeschwistern zeigte sich eine ähnliche Infiltration von entzündlichen Monozyten und Neutrophilen (Abb. 21A *Itgam*: P = .0737; 21B *Ly6c1*: P = .1965; 21C *Ly6g*: P = .3115). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Ahr-Aktivierung durch ITE im myeloischen Kompartiment nicht für die beobachtete Verschlimmerung der APAP-induzierten Leberschädigung verantwortlich war.

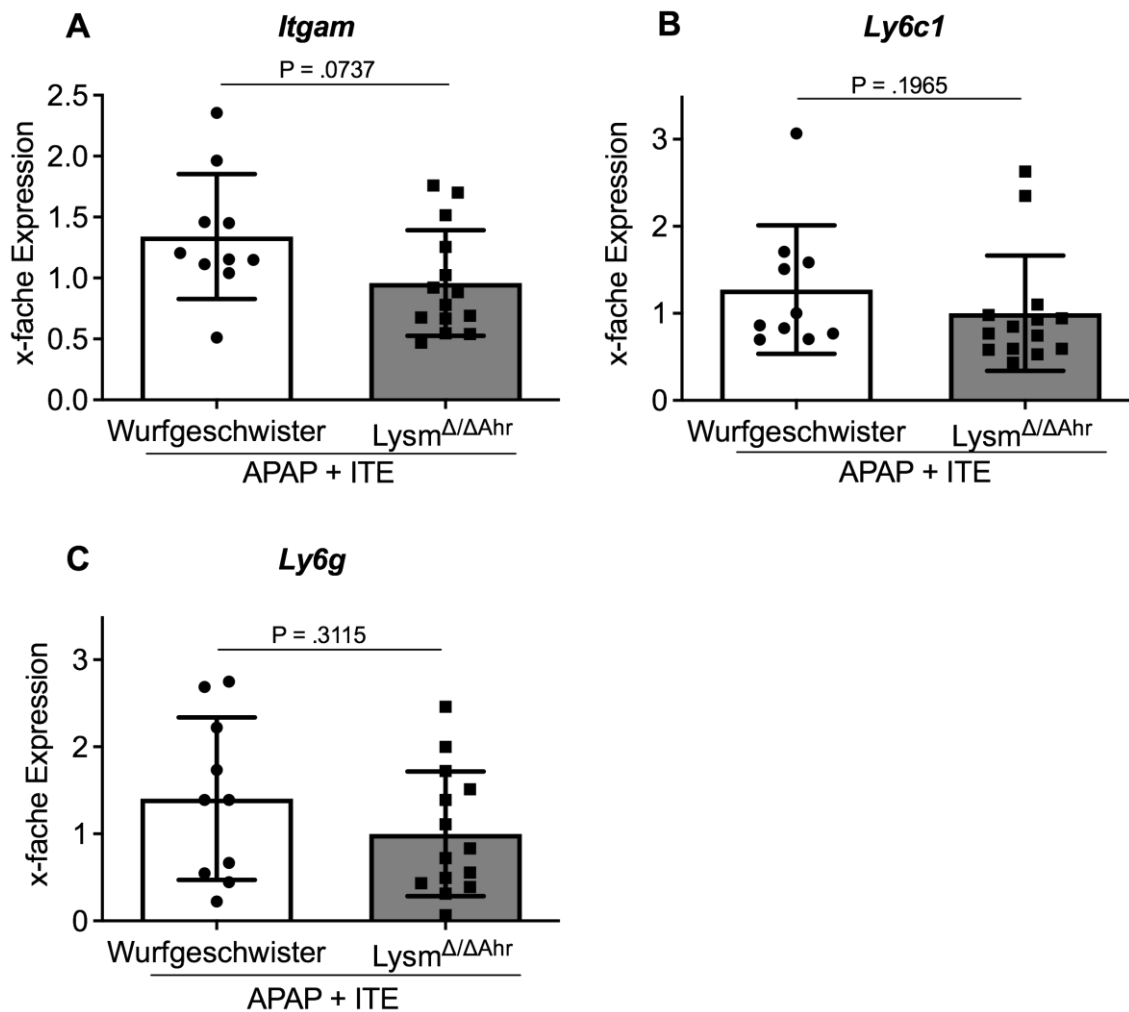


Abb. 21: Keine unterschiedliche Infiltration von entzündlichen Monozyten oder Neutrophilen in *LysM*^{Δ/ΔAhr}-Mäusen und ihren Wurfgeschwistern. Männliche *LysM*^{Δ/ΔAhr}-Mäuse (n=14) oder Wurfgeschwisterkontrollen (n=10) wurden mit ITE + APAP behandelt und 4 h nach der APAP-Behandlung analysiert. Es wurde keine signifikant unterschiedliche mRNA-Expression von **(A)** *Itgam* oder **(B)** *Ly6c1* und **(C)** *Ly6g* gefunden. Die Zielgenexpression ist als x-fache Expression im Vergleich zur Vehikel Kontrolle dargestellt.

3.1.6 Die Ahr-Aktivierung in Hepatozyten ist verantwortlich für die ITE-vermittelte Induktion der hyperakuten APAP-Hepatotoxizität

Um die Beteiligung der Ahr-Aktivität bei der APAP-Intoxikation auf zellulärer Ebene weiter aufzuklären, wurden anschließend konditionale Ahr-KO-Mäuse, denen die Ahr-Expression in Hepatozyten (*Alb*^{Δ/ΔAhr}) fehlt, verwendet. Die qPCR-Analyse bestätigte ein Fehlen der *Ahr*-Expression in der hepatozytären mRNA (Abb. 22A, P = .0007). Wie schon in 3.1.5 erläutert, wurde auch den *Alb*^{Δ/ΔAhr}-Mäusen und ihren Wurfgeschwistern zunächst eine einzelne subletale APAP-Dosis verabreicht. Erstaunlicherweise war die Leberschädigung nach der alleinigen APAP-Behandlung in *Alb*^{Δ/ΔAhr}-Mäusen, denen Ahr in den Hepatozyten fehlte, im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern mit funktionellem Ahr

nach 8 Stunden signifikant reduziert (Abb. 22B, ALT: $P = .0300$; Abb. 22C, AST: $P = .0358$). Somit schien bereits eine physiologische Ahr-Grundaktivität in Hepatozyten die APAP-induzierte Leberschädigung in den Wurfgeschwistern zu verschlimmern.

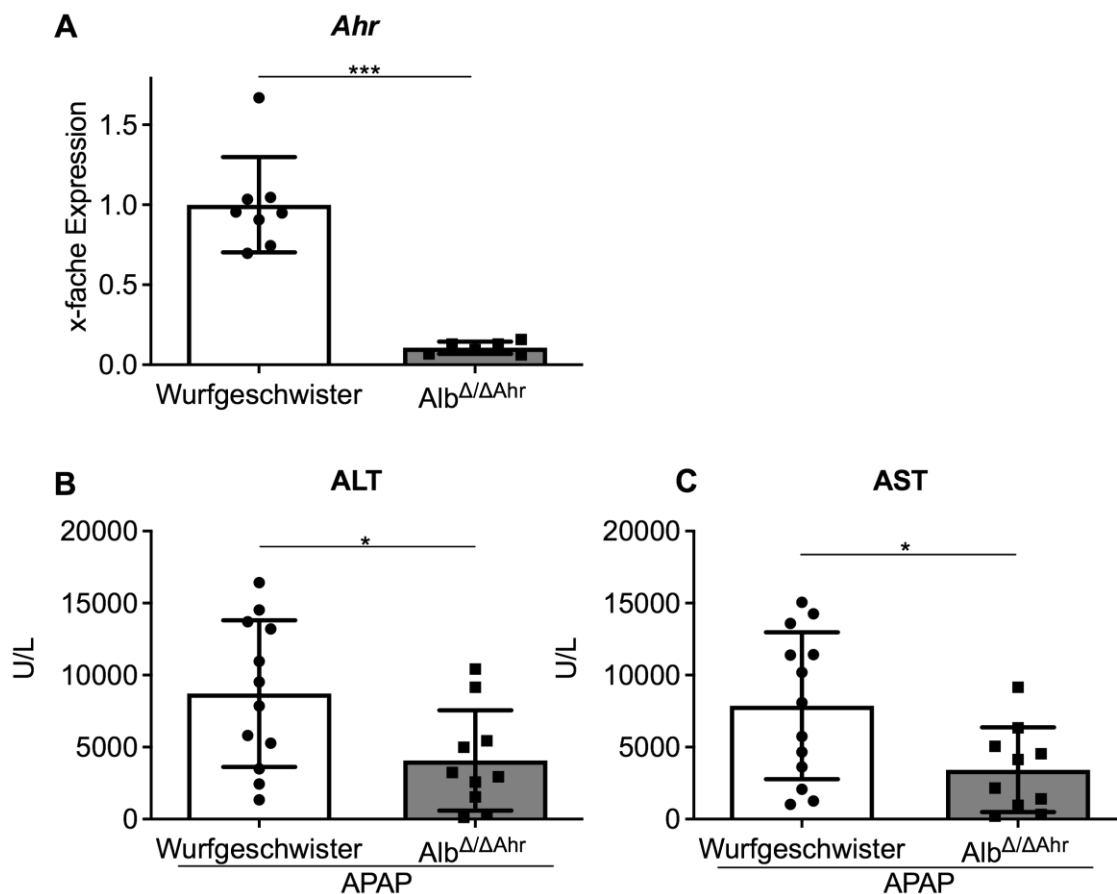


Abb. 22: Prüfung der *Alb Δ/Δ Ahr*-Defizienz und ihrer Auswirkung in der APAP-Hepatotoxizität. (A) qPCR-basierter Nachweis des effizienten Ahr-Knockdowns in Hepatozyten von *Alb Δ/Δ Ahr*-Mäusen im Vergleich zu Wurfgeschwisterkontrollen (n=6-8). *Alb Δ/Δ Ahr*-Mäuse oder ihre Wurfgeschwister wurden mit APAP allein behandelt und die Serumtransaminasen (B) ALT und (C) AST 8 h nach der Behandlung gemessen (n=10-12). Für die Experimente wurden weibliche Mäuse verwendet. * $P < .05$, *** $P < .001$.

Bei einer kombinierten ITE- und APAP-Behandlung waren interessanterweise die *Alb Δ/Δ Ahr*-Mäuse im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern nach 4 Stunden weitgehend vor einer Verschlimmerung der Krankheit geschützt, was darauf hindeutet, dass die Aktivierung von Ahr in Hepatozyten die Hauptdeterminante für die ITE-vermittelte Verschlimmerung der APAP-induzierten Leberschädigung ist. Dementsprechend war der allgemeine Körperzustand der *Alb Δ/Δ Ahr*-Mäuse signifikant verbessert (Abb. 23A, $P < .0001$) und die Serum-ALT- (Abb. 23B, $P = .0012$) und AST-Werte (Abb. 23C, $P = .0002$) waren im Vergleich zu den Wurfgeschwisterkontrollen signifikant niedriger.

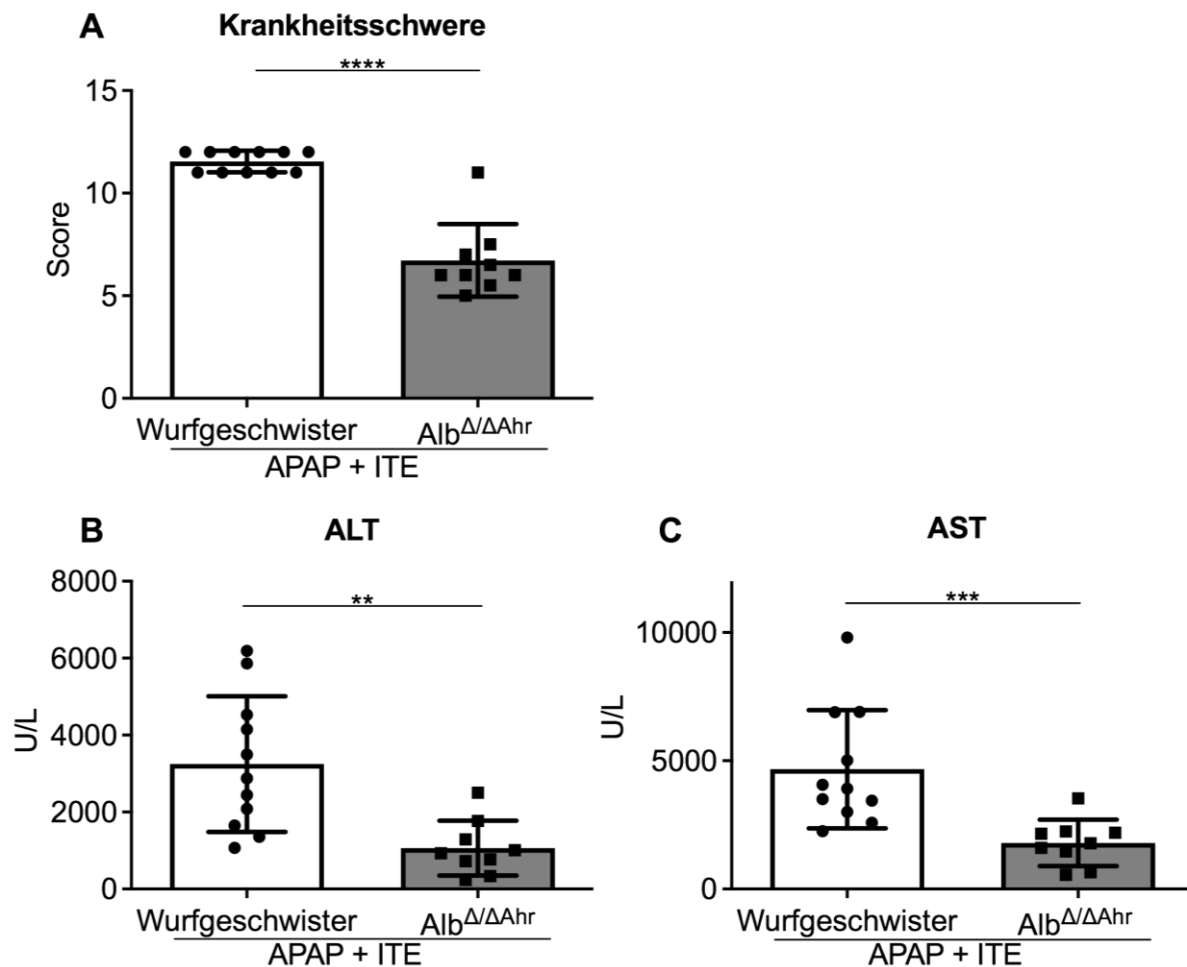
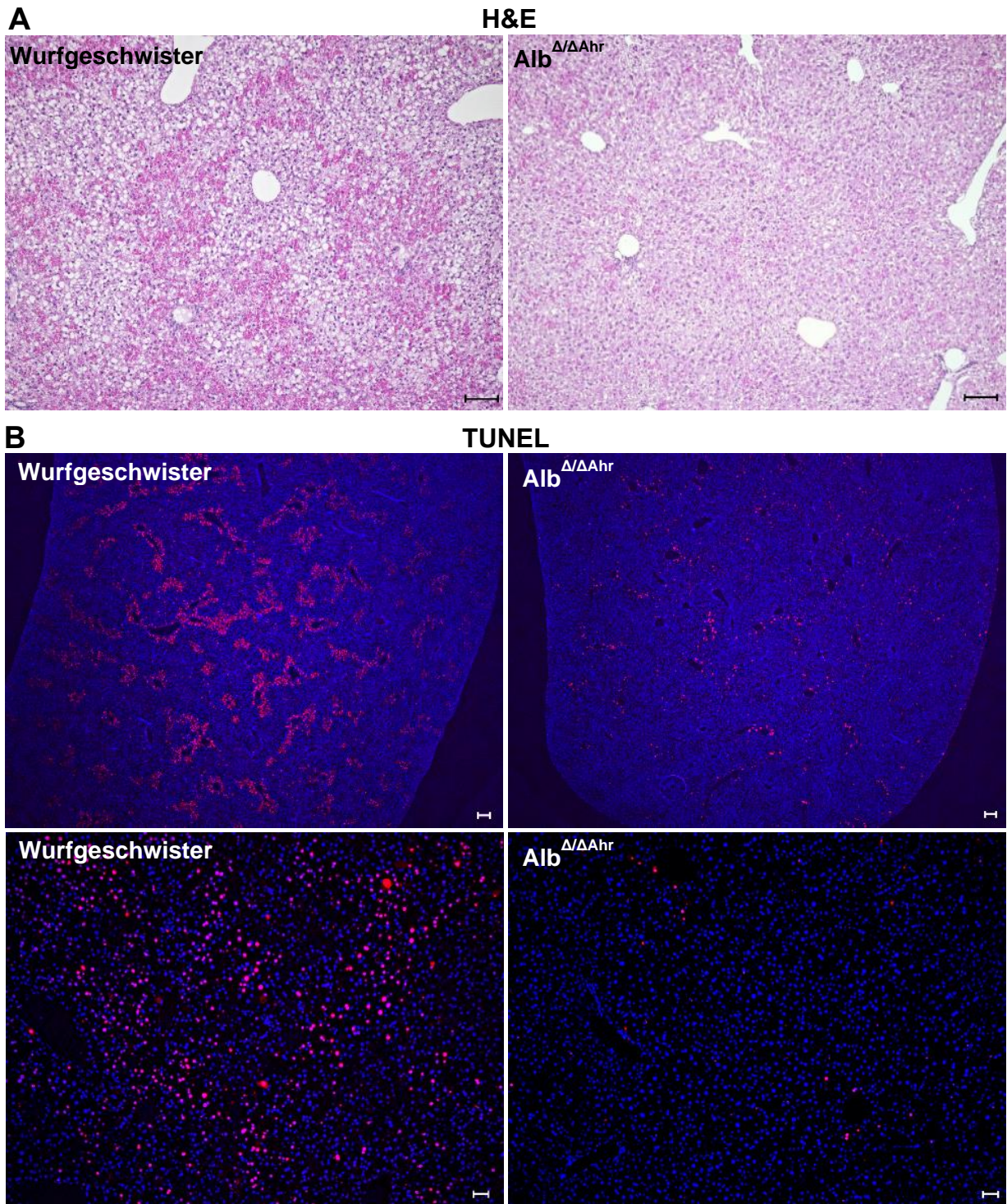


Abb. 23: Die ITE-vermittelte Induktion der hyperakuten APAP-Hepatotoxizität ist abhängig von der Ahr-Aktivierung in Hepatozyten. Weibliche Alb^{Δ/ΔAhr}-Mäuse (n=9) oder Wurfgeschwisterkontrollen (n=11) wurden mit ITE + APAP behandelt und nach 4 h analysiert. **(A)** Krankheitsschwere, Serumtransaminasen **(B)** ALT und **(C)** AST. **P < .01, ***P < .001, ****P < .0001.

Ergänzend zu diesen Ergebnissen zeigte sich ebenso in der Histologie eine signifikant reduzierte Schädigung des Lebergewebes von Alb^{Δ/ΔAhr}-Mäusen, unter anderem in der Feinanatomie mittels H&E-Färbung (Abb. 24A). Darüber hinaus bildeten die TUNEL- (Abb. 24B) und gespaltene Caspase-3-Färbung (Abb. 24C) von Leberschnitten eine stark reduzierte Hepatozytenschädigung in Alb^{Δ/ΔAhr}-Mäusen nach kombinierter APAP- und ITE-Behandlung im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern ab, was durch die jeweilige Quantifizierung als signifikant bestätigt wurde (Abb. 24D, P = .0070, 24E, P = .0317).



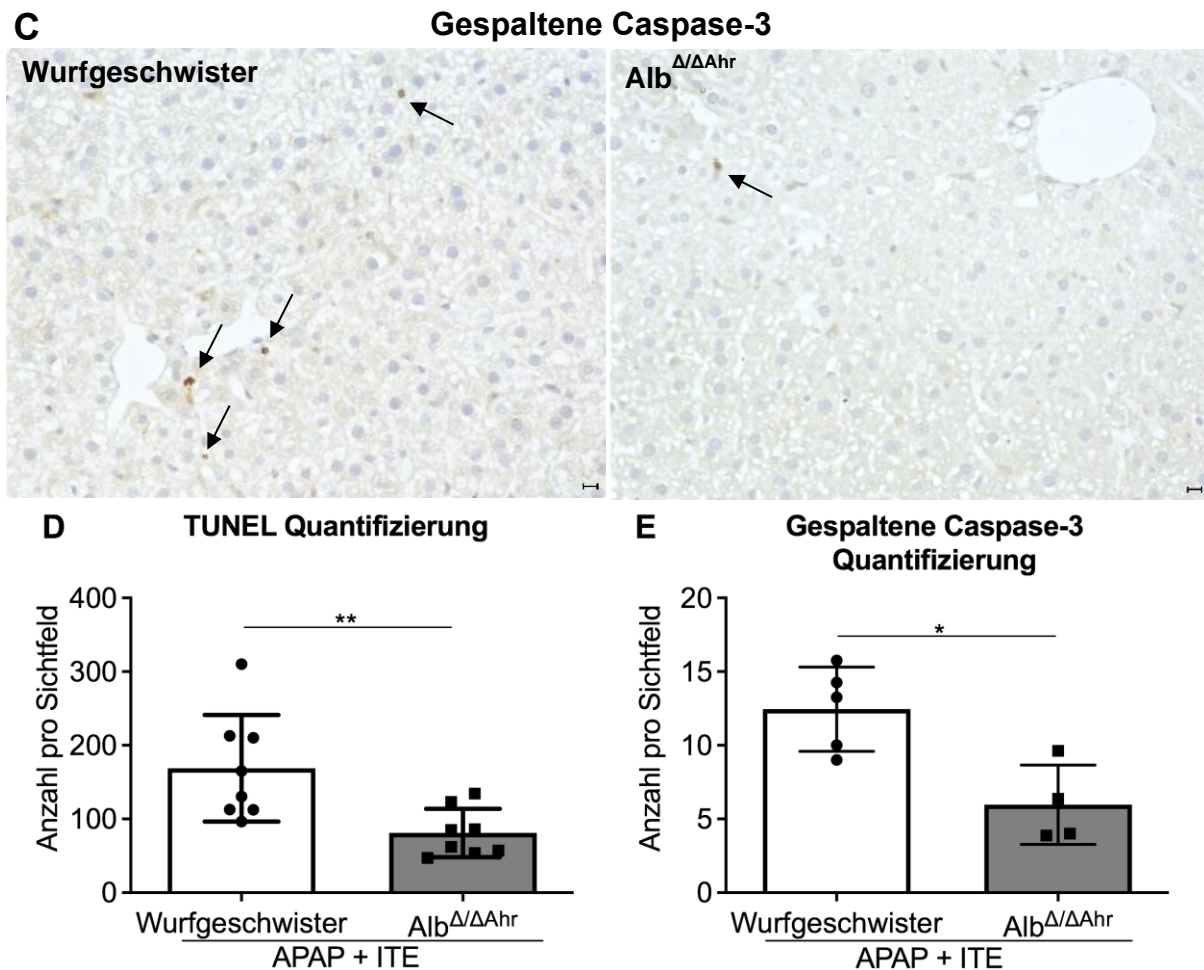
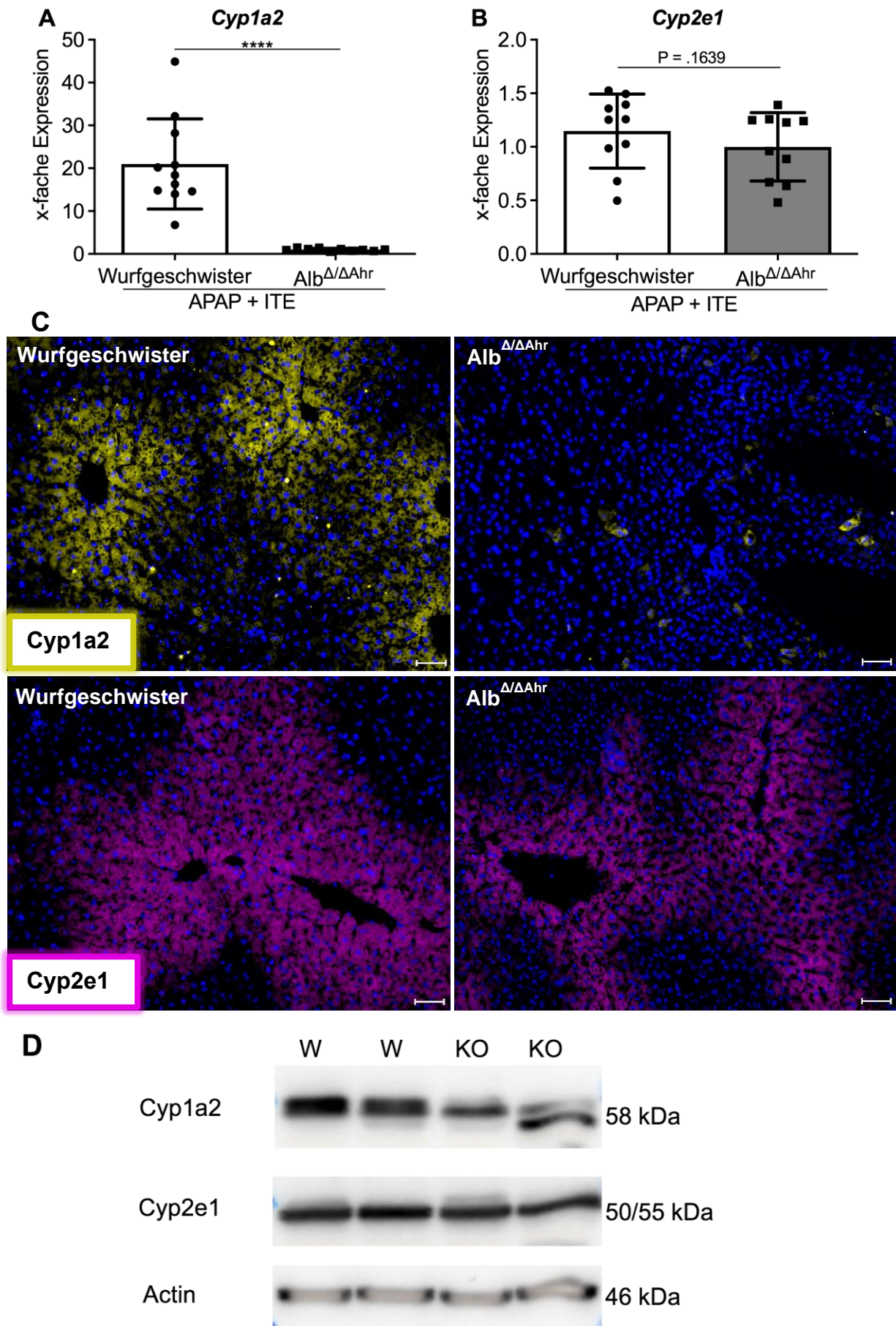


Abb. 24: Reduzierte Gewebeschäden in Alb^{Δ/ΔAhr}-Mäusen nach Ahr-Aktivierung und APAP-Intoxikation. (A) H&E-Färbung (Maßstabsbalken: 100 µm), (B, D) TUNEL-Färbung abgestorbener Hepatozyten (rot, Kerne sind blau gefärbt n=8; Maßstabsbalken: obere Bilder, 200 µm; untere Bilder 50 µm) und (C, E) Analyse des Apoptose Markers gespaltene Caspase-3 (n=4-5) zeigten, dass Alb^{Δ/ΔAhr}-Mäuse vor ITE-induzierter hyperakuter APAP-Hepatotoxizität geschützt waren. Maßstabsleiste: 50 µm. *P < .05, **P < .01.

Mechanistisch gesehen war der Schutz vor einer verschlimmerten Hepatotoxizität in Alb^{Δ/ΔAhr}-Mäusen vor allem mit der signifikant geringeren Induktion von *Cyp1a2* (Abb. 25A, P < .0001) verbunden, während die mRNA-Expression von *Cyp2e1* (Abb. 25B, P = .1639) nur leicht reduziert war. Diese Befunde wurden zudem auf Proteinebene durch Immunfluoreszenzfärbung (Abb. 25C) sowie Immunoblotting (Abb. 25D; 25E, *Cyp1a2*: P = .0152; 25F, *Cyp2e1*: P = .1240) von *Cyp1a2* und *Cyp2e1* bestätigt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Induktion von *Cyp1a2* und nicht von *Cyp2e1* die Hauptursache für die beobachtete ITE-vermittelte Verschlimmerung der APAP-Toxizität ist.



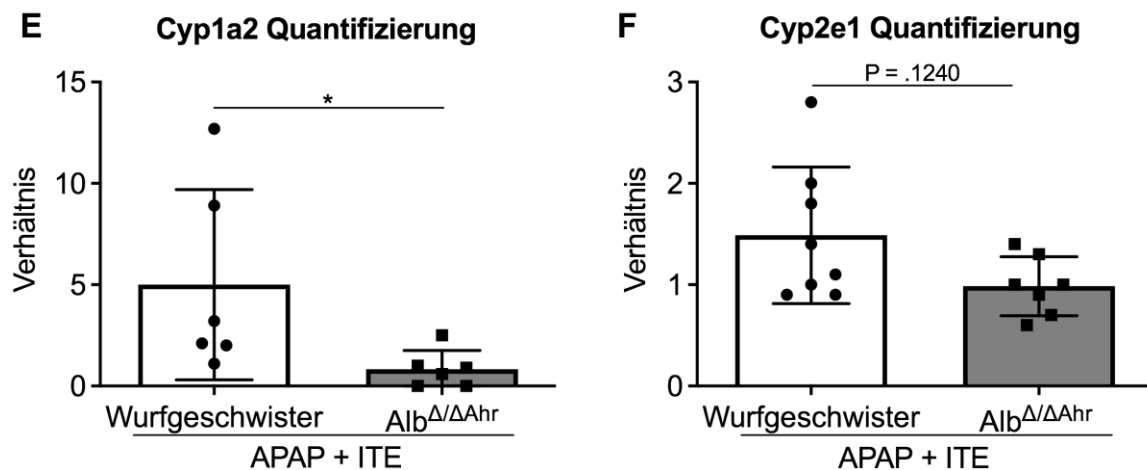


Abb. 25: Geringere Expression der APAP-metabolisierenden Enzyme Cyp1a2 und Cyp2e1 in Alb Δ/Δ Ahr-Mäusen bei der ITE-vermittelten hyperakuten APAP-Hepatotoxizität. Weibliche Alb Δ/Δ Ahr-Mäuse und Wurfgeschwisterkontrollen wurden mit APAP + ITE behandelt (n=9-11). Expression der APAP-metabolisierenden Enzyme Cyp1a2 und Cyp2e1 auf (A, B) mRNA- und (C, D) Proteinebene sowie ihre (E, F) Quantifizierung 4 h nach APAP-Injektion (W= Wurfgeschwister, KO= Alb Δ/Δ Ahr; n=6-8). Maßstab: 50 μ m. Die Zielgenexpression ist als x-fache Expression im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle dargestellt. *P < .05, ****P < .0001.

Hinsichtlich des APAP-Metabolismus war der Schutz vor einer Verschlimmerung der Krankheit in Alb Δ/Δ Ahr-Mäusen auch mit signifikant höheren GSH-Spiegeln (Abb. 20C, Gesamt-GSH: P = .0159) sowie signifikant verringerten Spiegeln zumindest des toxischen APAP-GSH-Addukts im Vergleich zu den Wurfgeschwisterkontrollen verbunden (Abb. 26D, P = .0095). Für die Addukte APAP-CYS und APAP-NAC ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen erkennen (Abb. 26E; 26F). Konträr zu der Beobachtung in Wildtyp-Mäusen (Abb. 13) und im Gegensatz zu ihren Wurfgeschwistern, wurde innerhalb der hepatischen Phase-II-Reaktion in Alb Δ/Δ Ahr-Mäusen das APAP in Verbindung mit Sulfotransferasen signifikant verstärkt abgebaut, was sich durch erhöhte Level des nicht-toxischen APAP-SUL Metaboliten widerspiegelte (Abb. 26A, P = .0381), wohingegen sich für die Glucuronidierung kein signifikanter Unterschied zwischen den Mäusen ergab (Abb. 26B, APAP-GLC: P = .9143). Insgesamt waren die Alb Δ/Δ Ahr-Mäuse im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern nach der ITE-Behandlung durch das Fehlen des Ahr in ihren Hepatozyten vor einer vermehrten Bildung von toxischen APAP-Addukten über Cyp1a2 geschützt. Zusammenfassend legen diese Ergebnisse nahe, dass eine hyperakute

APAP-induzierte Leberschädigung durch die Ahr-Aktivierung in Hepatozyten vermittelt wird und von der Akkumulation toxischer APAP-Addukte abhängt.

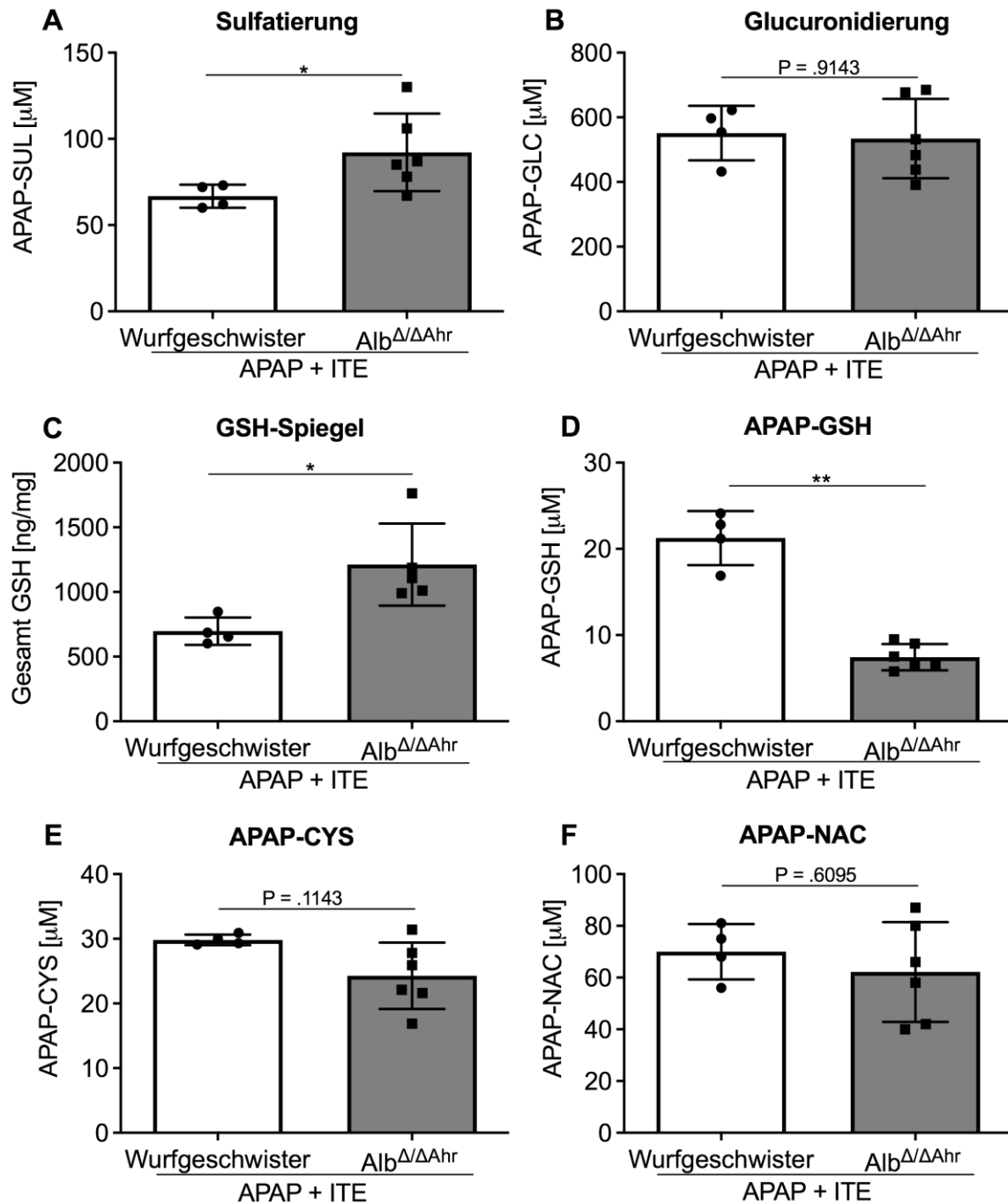


Abb. 26: Schutz vor einer ITE-vermittelten hyperakuten APAP-induzierten Leberschädigung in Alb Δ/Δ Ahr-Mäusen durch eine verminderte Akkumulation toxischer APAP-Addukte. APAP Ausscheidung über (A) Sulfat und (B) Glucuronsäure im Plasma sowie (C) der Gesamt-GSH-Spiegel im Lebergewebe und (D, E, F) toxische APAP-Addukte im Plasma 30 min nach APAP-Injektion in weiblichen Alb Δ/Δ Ahr-Mäusen (n=4) und Wurfgeschwister-Kontrollen (n=6). *P < .05, **P < .01.

Darüber hinaus wiesen die Lebern von $Alb^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Mäusen ebenfalls einen signifikant geringeren Entzündungsgrad im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern auf, was sich in einer verminderten hepatischen Expression der inflammatorischen Zytokine *Il6* (Abb. 27A, $P = .0159$), *Tnf* (Abb. 27B, $P = .0150$) und *Il1b* (Abb. 27C, $P = .0021$) zeigte.

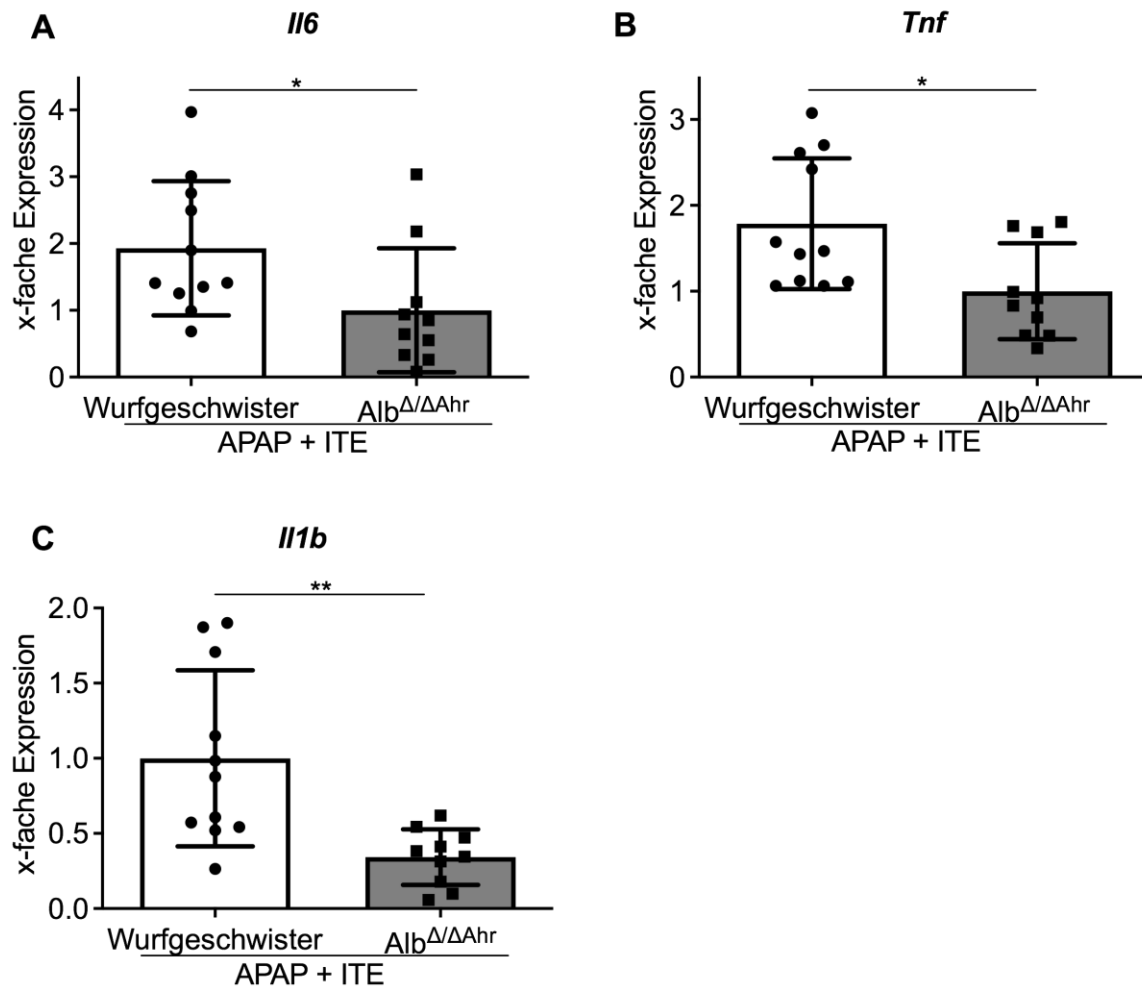
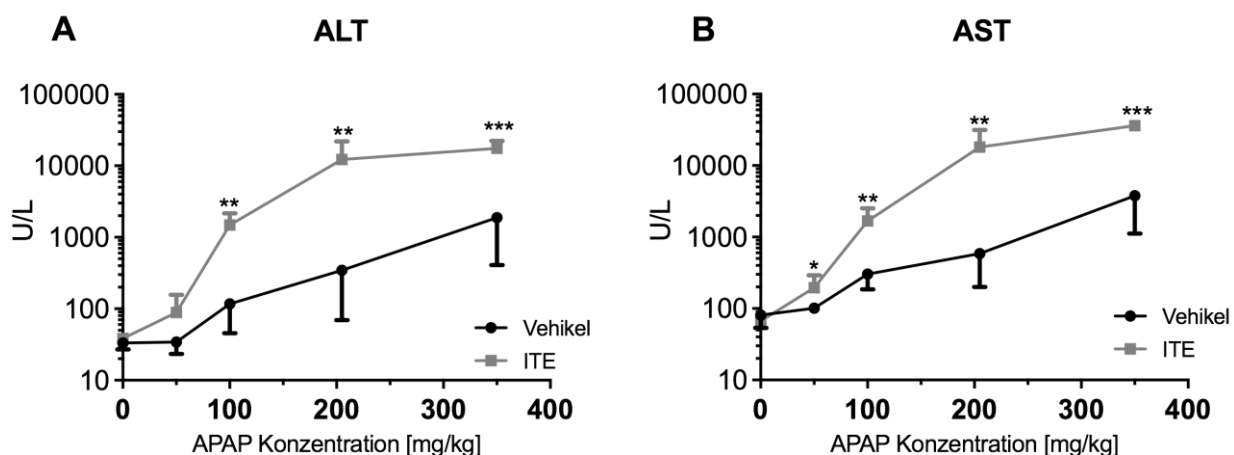


Abb. 27: Ausbleibende hyperakute APAP-Hepatotoxizität in $Alb^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Mäusen ist mit einer geringeren Expression von Entzündungsmediatoren verbunden. Weibliche $Alb^{\Delta/\Delta Ahr}$ -Mäuse ($n=9-10$) und Wurfgeschwister-Kontrollen ($n=11$) wurden mit APAP + ITE behandelt und nach 4 h wurde die mRNA-Expression der inflammatorischen Zytokine **(A)** *Il6*, **(B)** *Tnf* und **(C)** *Il1b* bestimmt. Die Zielgenexpression ist als x-fache Expression im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle dargestellt. * $P < .05$, ** $P < .01$.

3.1.7 Bereits bei niedriger APAP-Dosierung kann eine Ahr-Aktivierung hepatozelluläre Schäden induzieren

Bisher wurde in dieser Arbeit die Rolle der Ahr-Aktivierung bei der APAP-vermittelten Hepatotoxizität analysiert, die durch eine Überdosis von 350 mg/kg induziert wird, was beim Menschen 28,4 mg/kg entspricht. Um den Einfluss der Ahr-Aktivierung bei niedrigeren, subklinischen APAP-Dosen innerhalb des therapeutischen Rahmens zu bestimmen, wurde als nächstes ein Dosis-Eskalations-Experiment durchgeführt, bei dem WT-Mäuse mit 0, 50, 100, 205 oder 350 mg/kg APAP entsprechend den humanen Äquivalenzdosen 0, 4, 1, 8, 1, 16, 6 oder 28, 4 mg/kg (berechnet nach [233]) in Kombination mit 200 µg ITE oder Vehikel behandelt wurden (Abb. 28). Auffallend ist, dass bereits bei einer sehr niedrigen Dosis von 50 mg/kg APAP, die normalerweise keine Anzeichen einer Leberschädigung in Mäusen hervorruft, eine ITE-Vorbehandlung einen erheblichen Hepatozyten-Tod induzierte, was durch einen Anstieg der ALT- und AST-Serumspiegel gezeigt wurde (Abb. 28A, ALT: $P = .1255$; Abb. 28B, AST: $P = .0173$). Bei der Dosis von 205 mg/kg APAP in Mäusen, die der empfohlenen maximalen Einzeldosis von 1000 mg APAP bei einem Menschen mit 60 kg Körpergewicht entspricht, verschlimmerte eine zusätzliche ITE-Behandlung die APAP-Hepatotoxizität signifikant (Abb. 28A, ALT: $P = .0043$; Abb. 28B, AST: $P = .0022$). Um diese Befunde zu bestätigen, wurden die jeweiligen Leberschnitte mithilfe der TUNEL-Färbung analysiert. Wie erwartet, nahm die Anzahl der toten Hepatozyten mit steigender APAP-Dosis zu (Abb. 28C). Darüber hinaus zeigten die Lebern der ITE-behandelten Mäuse bei jeder getesteten APAP-Dosis deutlich mehr tote Zellen im Vergleich zu den Vehikel-Kontrollen, selbst bei niedrigen APAP-Dosen innerhalb des therapeutischen Bereichs (Abb. 28).



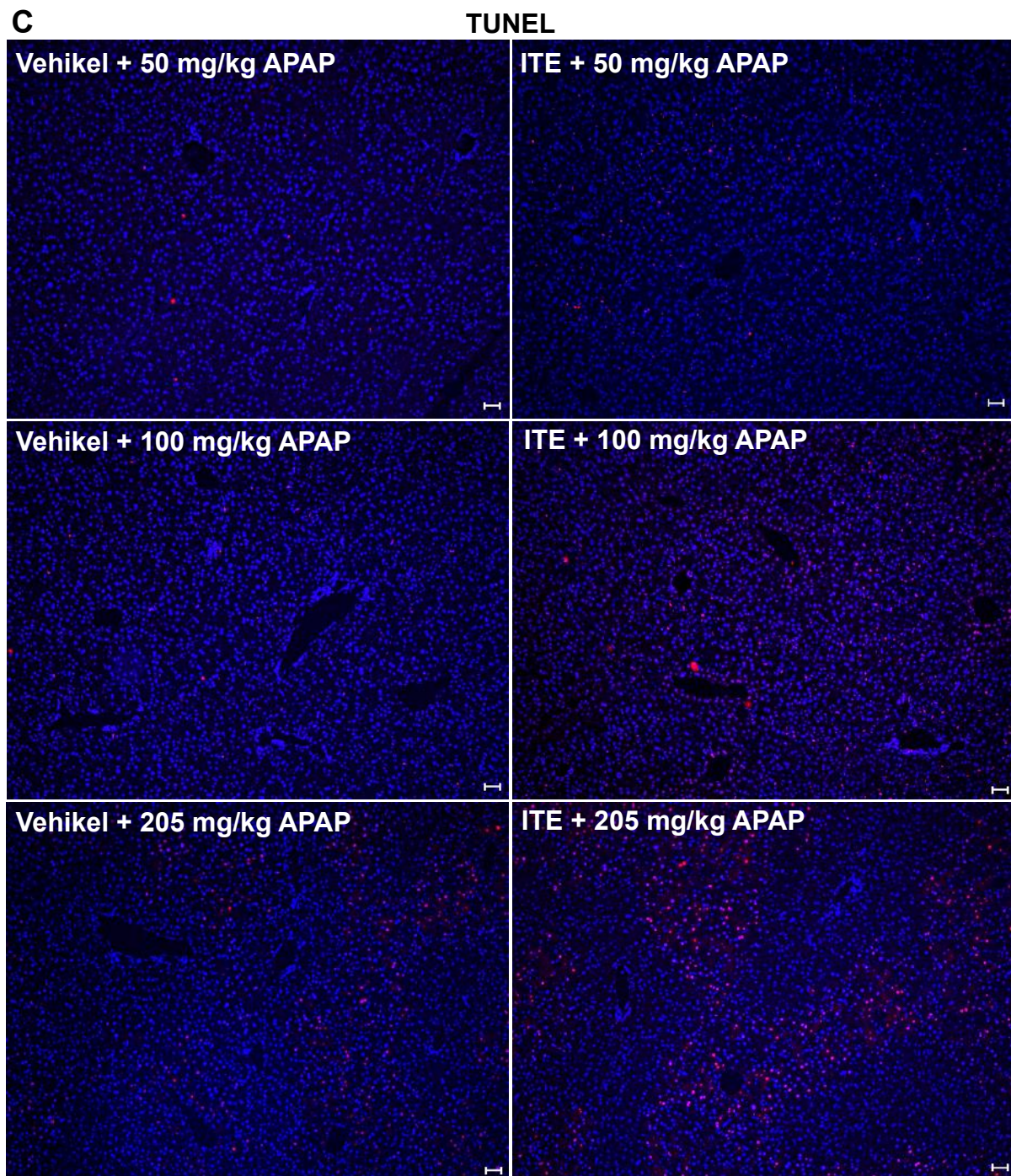


Abb. 28: Ahr-Aktivierung im APAP-Dosis-Eskalations-Experiment. Männliche WT-Mäuse wurden mit Vehikel oder ITE + eskalierenden Dosen von APAP (0, 50, 100, 205 oder 350 mg/kg; jeweils n=6) behandelt. **(A)** ALT- und **(B)** AST-Serumspiegel wurden 4 h nach APAP-Behandlung gemessen. **(C)** TUNEL-Färbung (rot) von repräsentativen Leberschnitten. Die Zellkerne sind blau gefärbt, Maßstabsbalken: 50 μ m. * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$.

Des Weiteren wurde in einem ITE-Dosis-Eskalations-Experiment festgestellt, ob die Sensibilisierung für hyperakute APAP-induzierte Leberschäden mit der Bioverfügbarkeit von Ahr-aktivierenden Liganden korreliert. Interessanterweise wurde bereits bei der

Verabreichung von niedrigen ITE-Dosen (d.h. 1/3 oder 1/10 der veröffentlichten therapeutischen Standarddosis [171, 234, 235]) die hepatozelluläre Schädigung signifikant erhöht, wie durch erhöhte Serumtransaminasewerte (Abb. 29A, ALT: $P = .0022$; 29B, AST: $P = .0022$) und eine erhöhte Anzahl von TUNEL-positiven Hepatozyten (Abb. 29C) gezeigt werden konnte. Somit können Ahr-Liganden bereits in niedrigen Konzentrationen die APAP-vermittelte Leberschädigung signifikant verschlimmern. Zusammengenommen unterstützen diese Ergebnisse eine mögliche klinische Relevanz der Ahr-Aktivierung für die Entwicklung der hyperakuten APAP-Hepatotoxizität.

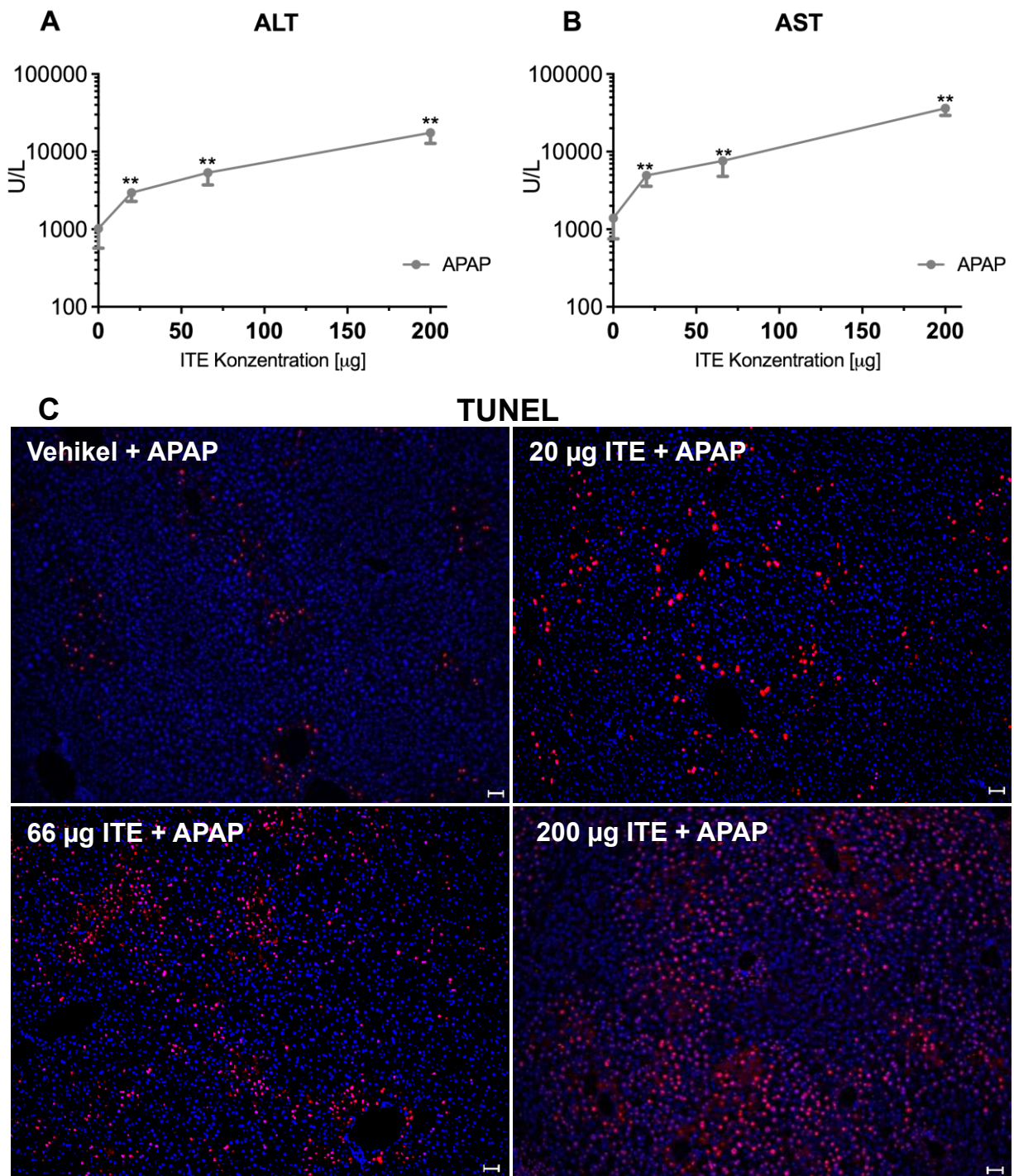
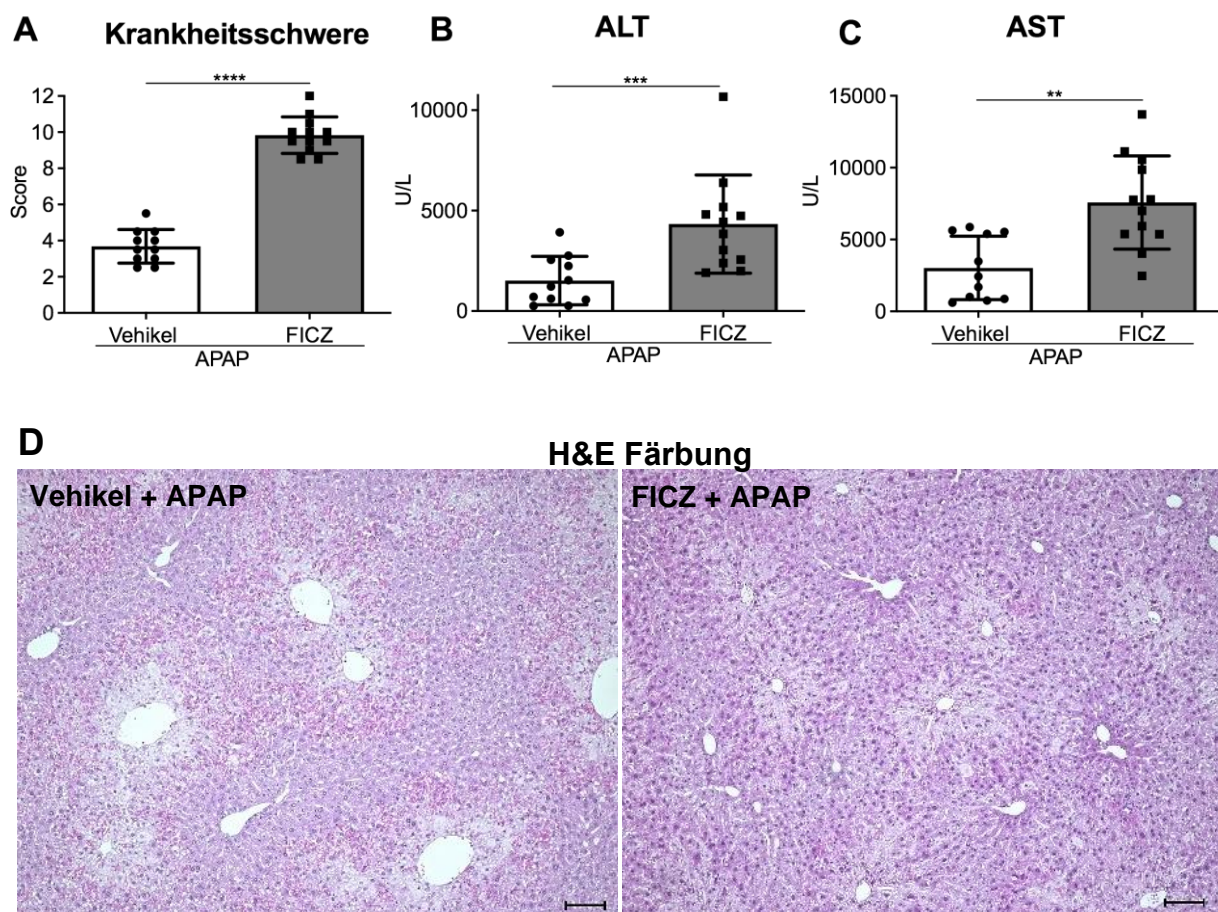


Abb. 29: ITE-Dosis-Eskalations-Experiment im APAP-Modell. Männliche WT-Mäuse wurden mit Vehikel oder mit eskalierenden Dosen von ITE (0, 20, 67, 200 μg , je $n=6$) + 350 mg/kg APAP behandelt. **(A)** ALT- und **(B)** AST-Serumspiegel wurden 4 h nach APAP-Behandlung gemessen. **(C)** TUNEL-Färbung (rot) von repräsentativen Leberschnitten. Die Zellkerne sind blau gefärbt. Maßstabsbalken: 50 μm . ****P < .01.**

3.2 Die Ahr-Aktivierung durch das Tryptophan-Derivat FICZ im APAP-Modell

Um zu bestätigen, dass die in den vorherigen Abschnitten beschriebene Verschlimmerung der APAP-induzierten Hepatotoxizität kein singulärer Effekt des Liganden ITE, sondern allgemein der Ahr-Aktivierung ist, wurde die APAP-Toxizität auch in Kombination mit einem weiteren Liganden, dem Tryptophan-Derivat FICZ, getestet. Ähnlich wie ITE steigerte FICZ die Hepatotoxizität deutlich, wenn es in Kombination mit APAP verabreicht wurde. Dies zeigte sich in einem verschlechterten Allgemeinzustand (Abb. 30A, $P < .0001$), einem Anstieg der Serumtransaminasen ALT (Abb. 30B, $P = .0010$) und AST (Abb. 30C, $P = .0017$), sowie einem vermehrten Hepatozyten-Sterben, das sowohl durch die H&E-Färbung (Abb. 30D) als auch durch die TUNEL- (Abb. 30E) und gesplante Caspase-3-Färbung (Abb. 30F) bestimmt und quantifiziert (Abb. 30G; 30H) wurde.



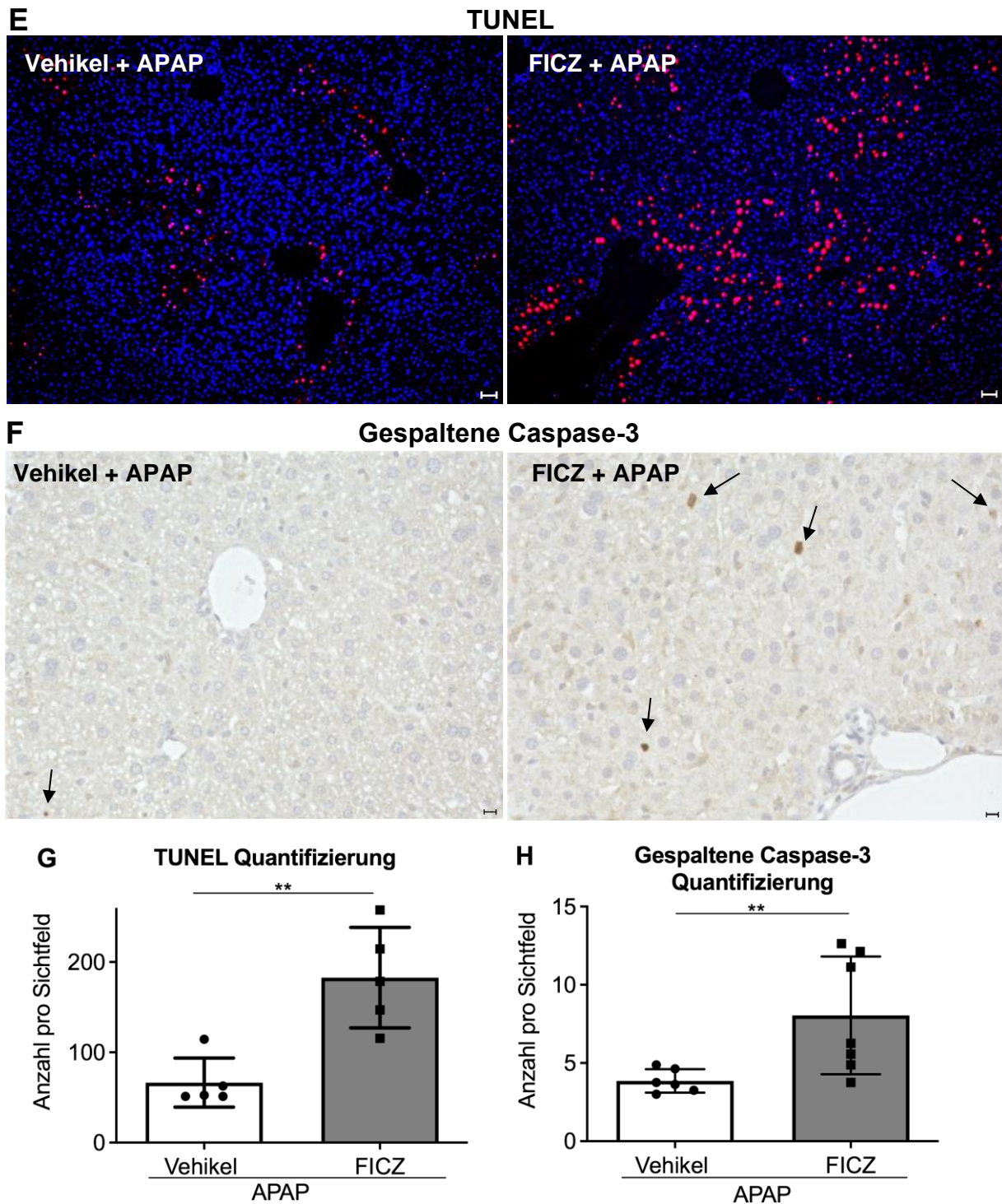


Abb. 30: Die Ahr-Aktivierung durch FICZ induziert hyperakute APAP-Leberschäden. Männliche WT-Mäuse wurden mit Vehikel + APAP oder FICZ + APAP behandelt (n=11-12). Die Proben wurden 4 h nach der APAP-Behandlung analysiert. **(A)** Krankheits-Score, der den Allgemeinzustand widerspiegelt, **(B, C)** Serum-Lebertransaminasen und Hepatozyten-Schäden, beurteilt durch **(D)** H&E, Maßstabsleiste: 100 μ m, **(E, G)** TUNEL (jeweils n=5; rot; Kerne sind blau gefärbt, Maßstabsbalken: 50 μ m) und **(F, H)** gespaltene Caspase-3-Färbung (n=6-7). **P < .01, ***P < .001, ****P < .0001.

Die FICZ-induzierte Krankheitssteigerung der APAP-induzierten Leberschädigung war mechanistisch ebenfalls, wie bereits in 3.1.2 erläutert, mit einer hepatischen Hochregulierung von *Ahr* (Abb. 31A, $P = .0013$) und *Cyp1a2* (Abb. 31B, $P < .0001$) verbunden. Bemerkenswert ist, dass die hepatische *Cyp2e1*-Expression in den mit FICZ behandelten Mäusen ähnlich wie in der Kontrollgruppe war (Abb. 31C, $P = .3793$), was bestätigt, dass *Cyp1a2* und nicht *Cyp2e1* der Hauptvermittler der *Ahr*-abhängigen Verschlimmerung der APAP-induzierten Hepatotoxizität zu sein scheint. Diese Befunde wurden durch Western Blot-Analysen von *Cyp1a2* (Abb. 31D; 31E, *Cyp1a2*: $P = .0383$) und *Cyp2e1* (Abb. 31D; 31F, *Cyp2e1*: $P = .1793$) auf Proteinebene bestätigt.

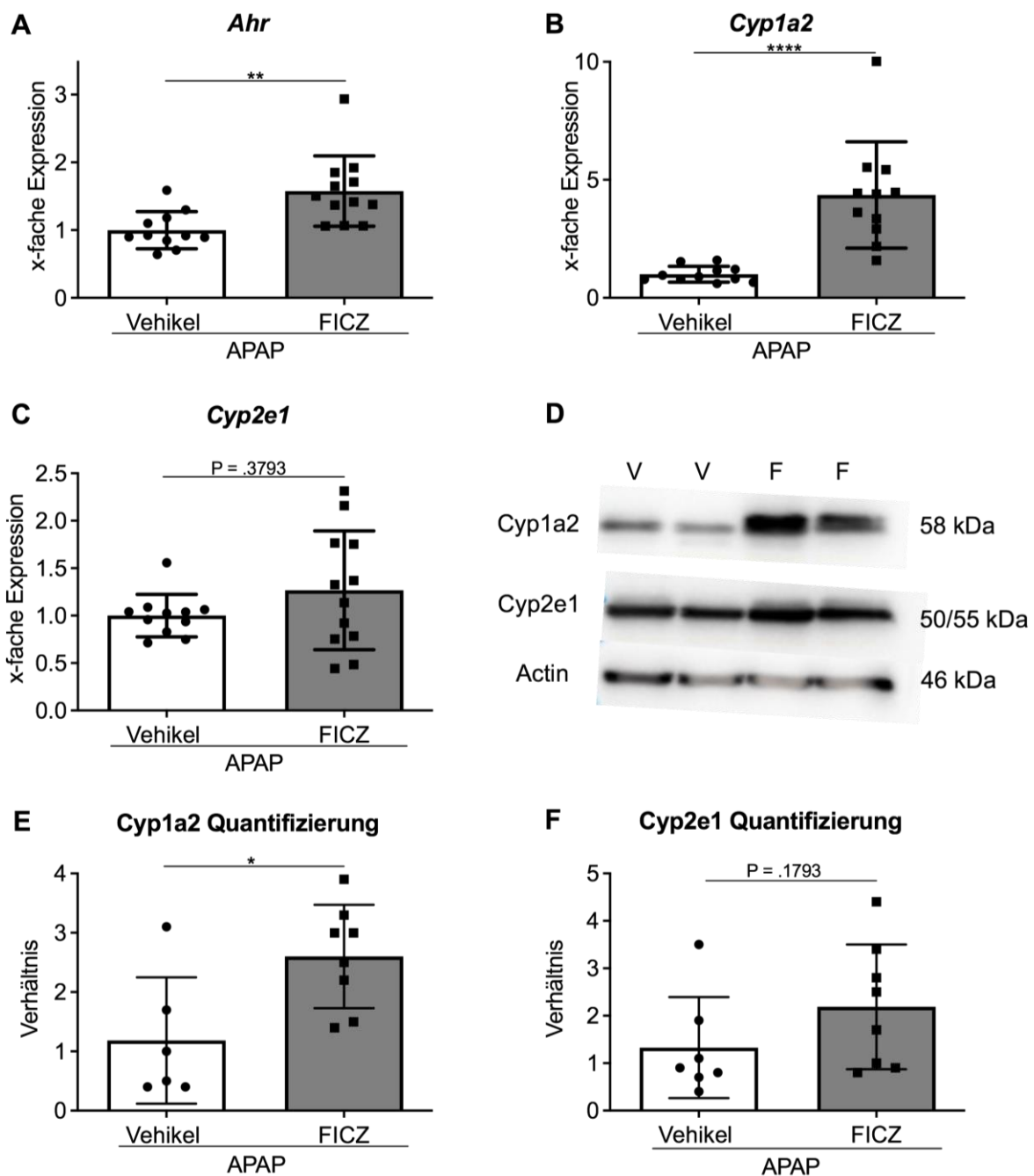


Abb. 31: Eine FICZ-induzierte Ahr-Aktivierung fördert die Expression des APAP-metabolisierenden Enzyms Cyp1a2. Hepatische Genexpression von (A) *Ahr*, (B) *Cyp1a2* und (C) *Cyp2e1* sowie (D, E, F) Western Blot-Analyse von Cyp1a2 und Cyp2e1 auf Proteinebene (V= Vehikel + APAP; F= FICZ + APAP) aus Lebergewebe von männlichen WT-Mäusen (n=11-12) 4 h nach der APAP-Behandlung. *P < .05, **P < .01, ****P < .0001.

Entsprechend den Beobachtungen an Mäusen, die eine kombinierte APAP- und ITE-Behandlung erhielten (3.1.3, Abb. 25), war zudem die erhöhte Leberschädigung bei Mäusen, die mit APAP und FICZ behandelt wurden, auch mit einer signifikant erhöhten Entzündungsreaktion durch eine hepatische Hochregulierung von inflammatorischen Zytokinen wie *Il6* (Abb. 32A, P = .0001), *Tnf* (Abb. 32B, P = .0006) und *Il1b* (Abb. 32C, P < .0001) verbunden.

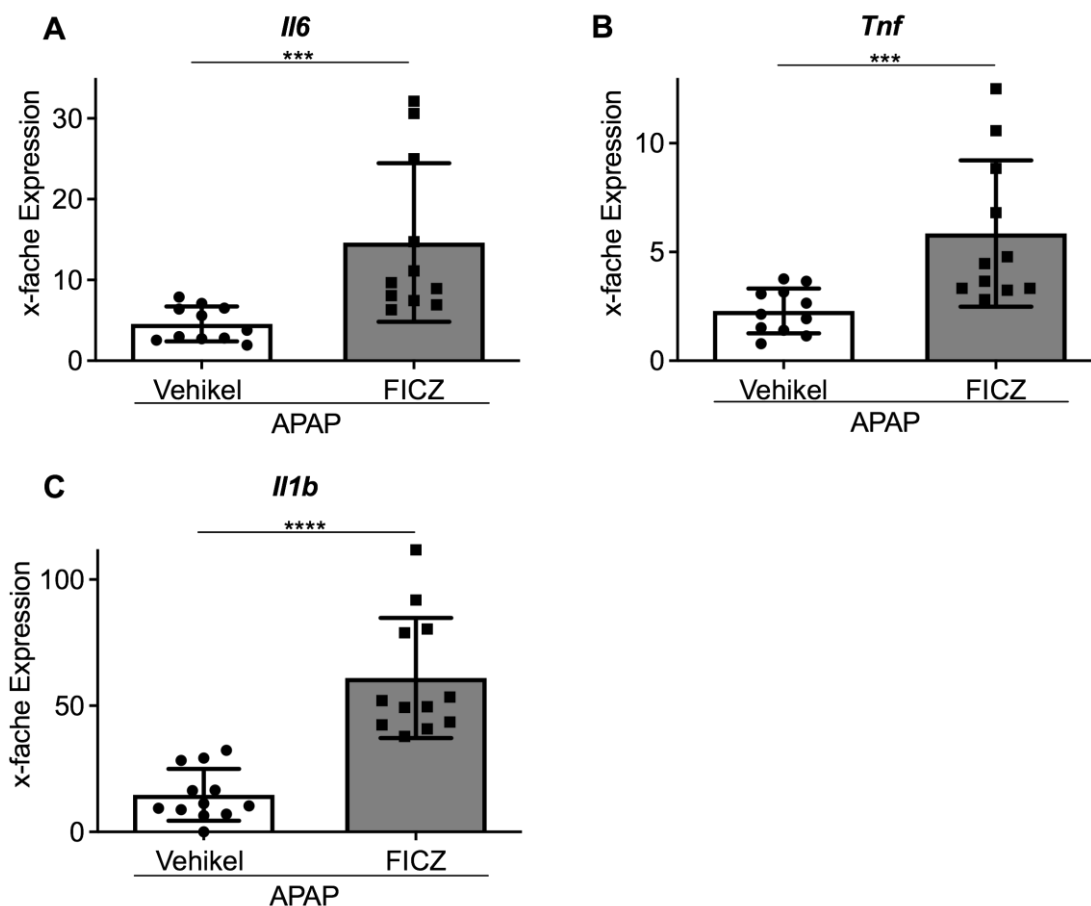


Abb. 32: Die FICZ-induzierte Exazerbation der APAP-Toxizität ist mit erhöhten Entzündungsmediatoren verbunden. Männliche WT-Mäuse wurden mit Vehikel + APAP oder FICZ + APAP behandelt (n=11-12). Hepatische Genexpression der inflammatorischen Zytokine (A) *Il6*, (B) *Tnf* und (C) *Il1b* 4 h nach der Behandlung. ***P < .001, ****P < .0001.

Somit fördert, wie in 3.1.7 beschrieben, die Ahr-Aktivierung durch nicht-toxische Liganden wie ITE oder FICZ die APAP-induzierte hyperakute Leberschädigung, im Falle von ITE bereits schon bei therapeutischen Standarddosierungen.

4. Diskussion

Leberschäden, die durch das frei verkäufliche Schmerzmittel Paracetamol (APAP) induziert werden, sind eine der häufigsten Ursachen für akutes Leberversagen. In der Regel treten unerwünschte Reaktionen auf APAP nur bei der Einnahme einer Überdosis auf, doch auch therapeutische Dosen können bei einigen Personen toxische Leberschäden hervorrufen. Die Risikofaktoren, die Personen für eine APAP-Toxizität sensibilisieren, sind bis heute wenig erforscht. In dieser Arbeit wurde der Einfluss des Transkriptionsfaktors Ahr auf den APAP-Metabolismus in einem umfassenden Ansatz auf biochemischer und molekularbiologischer Grundlage untersucht. Dabei wurden Mäuse einer kombinierten Behandlung mit APAP und nicht-toxischen Ahr-aktivierenden Liganden unterzogen, die sich in verschiedenen präklinischen Studien für Autoimmunerkrankungen als therapeutisch wirksam erwiesen haben [171, 234-237] und perspektivisch in Patienten mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen zur Anwendung gebracht werden könnten. Ein besseres Verständnis der komplexen Zusammenhänge bezüglich der individuellen APAP-Sensibilität und einer Ahr-Aktivierung ist notwendig, um 1) zu klären, ob Ahr als therapeutisches Zielmolekül bei hyperakuter APAP-Toxizität dienen könnte und 2) um das Risiko schädlicher Wechselwirkungen bei gleichzeitiger therapeutischer Gabe von APAP und Ahr-Liganden zu definieren.

4.1 Die Ahr-Aktivierung induziert eine hyperakute APAP-Hepatotoxizität

Obwohl Paracetamol eines der weltweit am häufigsten konsumierten Medikamente ist, gibt es überraschend wenig qualitative Daten, die Aufschluss darüber geben, warum bestimmte Personen ein größeres Risiko für die Entwicklung von APAP-induzierten Leberschäden haben als andere [137]. In Anbetracht der Tatsache, dass infolge der Ahr-Aktivierung eine Vielzahl an Entgiftungsgenen transkriptionell induziert wird, einschließlich der APAP-metabolisierenden Cytochrom-P450-Enzyme der Phase-I wie Cyp1a2 [238, 239], wurde in dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass Ahr-aktivierende Liganden die Bildung toxischer APAP-Metaboliten erhöhen könnte. Dementsprechend könnte der individuelle Aktivierungsgrad von Ahr durch nicht-toxische Liganden oberhalb eines bestimmten Schwellenwerts zumindest teilweise erklären, warum Menschen unterschiedlich empfindlich auf APAP reagieren. In der Tat konnte in der vorliegenden Studie festgestellt werden, dass die kombinierte Behandlung

von Mäusen mit einer aus der Literatur angegebenen therapeutischen Dosis ITE und einer subletalen Dosis APAP zu einer hyperakuten APAP-induzierten Leberschädigung führt (Abb. 8-10). Diese hatte fatale Folgen für die Mäuse mit einer Mortalität von 80 % in den ersten 8 Stunden nach APAP-Intoxikation (Abb. 8B). Folglich wurde der Analysezeitpunkt in unserer Studie auf 4 Stunden verkürzt, obwohl er im APAP-Modell klassischerweise auf 8 bis 24 Stunden angesetzt wird [66, 138]. Der verschlimmerte Phänotyp von Mäusen mit einer hyperakuten APAP-induzierten Leberschädigung war mit einer erhöhten Leberinfiltration von CD11b⁺ Zellen, hauptsächlich von CD11b⁺Ly6G^{hi}Ly6C^{int} Neutrophilen (Abb. 14, Abb. 15) und einer signifikant erhöhten Expression von inflammatorischen Zytokinen verbunden (Abb. 16). Bekanntlich wird APAP in der Leber über die Phase-II-Reaktion der Glucuronidierung und Sulfatierung (ca. 90 %) sowie über die Phase-I Cytochrom-P-450 Enzyme (ca. 5 %) abgebaut und über den Urin und die Galle ausgeschieden [16, 35, 36, 54-56]. Bei Betrachtung des APAP-Metabolismus schien die ITE-induzierte Ahr-Aktivierung einen Einfluss auf die Phase-II-Reaktion der Leber zu haben, denn die zuvor mit ITE behandelten Wildtyp-Mäuse wiesen nach der APAP-Intoxikation signifikant erhöhte Level des nicht-toxischen Metaboliten APAP-GLC auf, wohingegen APAP-SUL keinen Unterschied zeigte (Abb. 13A, Abb.13B). Übereinstimmend zu dieser Beobachtung berichten einige Studien in anderen Kontexten ebenfalls über eine Ahr-induzierte Hochregulierung der Glucuronosyltransferasen [240-245], während Ahr-Agonisten die Expression von Sulfotransferasen unterdrücken [246]. Demnach gilt Ahr nicht nur als Induktor der Phase-I-Enzyme, sondern auch der Phase-II-Enzyme [239, 247-249]. Besonders relevant für die in dieser Arbeit beobachtete Ahr-abhängige hyperakute APAP-induzierte Leberschädigung ist jedoch, dass die kombinierte Behandlung mit ITE und APAP das Phase-I-Enzym Cyp1a2 signifikant um ein Vielfaches steigerte (Abb. 11, Abb. 12). Dies förderte die Bildung toxischer APAP-Metabolite, wie APAP-GSH, APAP-CYS und APAP-NAC (Abb. 13). Für Cyp2e1, welches laut der Literatur maßgeblich am APAP-Metabolismus beteiligt ist, konnte hingegen eine signifikant erhöhte Expression ausschließlich auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (Abb. 11, Abb. 12). Somit wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass Ahr über das Phase-I-Enzym Cyp1a2 die Bildung toxischer APAP-Metabolite verstärkt und zu einer hyperakuten APAP-Toxizität entscheidend beiträgt. Es kann angenommen werden, dass die Ahr-Aktivierung den APAP-Abbau und die Ausscheidung über den Phase-II-Weg zwar in erster Instanz verstärkt hat, dies aber aufgrund der gleichzeitig Ahr-vermittelten massiv erhöhten Akkumulation von toxischen Metaboliten zu einer hyperakuten APAP-induzierten

Leberschädigung führte. Auch wurde miR-375 als neuartiger Repressor der UGT1A-vermittelten hepatischen APAP-Glucuronidierung durch eine reduzierte Ahr Expression identifiziert, was das erhöhte Risiko für APAP-induziertes Leberversagen bei einigen Personen erklären könnte [245]. In unserer Studie zeigt sich aber, dass die erhöhte Ahr-Aktivierung selbst als Risikofaktor gilt, da Ahr zwar die Glucuronosyltransferase hoch reguliert, es durch die gleichzeitige gesteigerte Expression von Cyp1a2 und der vermehrten Bildung toxischer Metabolite letztendlich aber trotz des gesteigerten Abbaus in der Phase-II zu einem hyperakuten APAP-Leberversagen kommt.

Die dargestellten Ergebnisse konnten mit dem unabhängigen Ahr-Liganden FICZ bestätigt werden, der ähnlich wie ITE zur Krankheitsverschlimmerung im APAP-Modell führte. In der Tat wurde auch durch den Liganden FICZ der Allgemeinzustand während der APAP-Intoxikation erheblich verschlechtert (Abb. 30), verbunden mit enormen histologischen hepatozellulären Schäden (Abb. 30), einer signifikant verstärkten Entzündungsreaktion (Abb. 32) sowie einer signifikant erhöhten Cyp1a2-Expression (Abb. 31). Somit könnte eine erhöhte Bioverfügbarkeit von Ahr-Liganden aus Umwelt, Nahrung oder Mikrobiom, wie hier für ITE und FICZ im Mausmodell gezeigt, auch die individuelle Empfindlichkeit von Patienten gegenüber APAP-induzierter akuter Leberschädigung erklären.

Laut der Fachliteratur spielt das Geschlecht bei der APAP-induzierten Leberschädigung eine zentrale Rolle. Es wurde beschrieben, dass männliche Mäuse in der Regel eine höhere Empfindlichkeit gegenüber APAP aufweisen als weibliche Mäuse. Unabhängig von ihrem genetischen Hintergrund entwickeln weibliche Mäuse in der Regel weniger Nekrosen als männliche [138]. Zudem zeigten Männchen nach 6 Stunden einen deutlichen Anstieg der ALT im Serum während dieser bei weiblichen Mäusen moderater war [231, 232], dabei waren die APAP-Proteinaddukte in beiden Geschlechtern vergleichbar [231]. Obwohl auch in dieser Arbeit entsprechende geschlechtsspezifische Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber APAP beobachtet wurden, war die schädliche Wirkung der Ahr-Aktivierung auf die APAP-Hepatotoxizität bei weiblichen und männlichen Mäusen allgemein ähnlich (Abb. 17). Wie in der Literatur beschrieben, unterschieden sich zwar die Serumtransaminasen, doch verglichen mit einer alleinigen APAP-Intoxikation hatte die kombinierte ITE-Behandlung bei beiden Geschlechtern eine verheerende Wirkung. Dabei waren die Cyp1a2-Expressionsniveaus vergleichbar (Abb. 17D). Diese Erkenntnisse zeigen, dass das mechanistische Einwirken von Ahr über die Cyp1a2-Achse geschlechtsunabhängig ist.

Es ist wichtig zu betonen, dass im Umfang dieser Studie die wiederholte Verabreichung des nicht-toxischen Ahr-Liganden ITE allein ohne APAP-Gabe in keinem der Experimente nachteilige Auswirkungen für die Mäuse zeigte (Abb. 8, Abb. 9, Abb. 10, Abb. 14, Abb. 15, Abb. 16). Somit stellt unsere Studie das beschriebene große therapeutische Potenzial nicht-toxischer natürlicher Ahr-Liganden als potente Immunsuppressiva [171, 234-237] im Allgemeinen nicht in Frage. Allerdings deuten die Ergebnisse daraufhin, dass von einer gleichzeitigen therapeutischen Verabreichung von Ahr-Liganden und APAP dringend abzuraten ist, denn die hier im Mausmodell dargelegten schädlichen Wechselwirkungen könnten auch beim Menschen zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen. Auch die potenzielle Wechselwirkung von Ahr mit anderen Arzneimitteln sollte dabei nicht außer Acht gelassen werden, denn auch hier könnte Ahr das pharmakokinetische und pharmakodynamische Profil beeinflussen. Der Ahr kann durch ein strukturell vielfältiges Spektrum von Chemikalien aktiviert werden und obwohl die Fähigkeit vieler dieser Chemikalien, direkt an den Ahr zu binden und ihn zu aktivieren, noch nicht umfassend bestätigt wurde, spricht in Tiermodellen oder Zellkultur einiges für ihre Interaktion mit dem Ahr. Interessanterweise wurden 158 Arzneimittel identifiziert, die eine Ahr-abhängige Genexpression induzieren können [250-253]. Berichten zufolge haben diese eine geringe Ahr-Affinität oder binden nicht kompetitiv an den Ahr. Es wird vermutet, dass diese Substanzen die Ahr-abhängige Genexpression indirekt aktivieren können, entweder durch metabolische Umwandlung in einen Liganden oder durch ihre Fähigkeit einen zellulären Signalweg zu beeinflussen, der zur Ahr-Aktivierung führt [162, 253]. Demnach dürften hohe therapeutische Dosen und eine chronische Behandlung mit diesen Medikamenten zu einer erheblichen Ahr-Aktivierung führen, weshalb auch bei einer gleichzeitigen Therapie mit APAP und diesen Wirkstoffen Vorsicht geboten ist.

4.2 Zellspezifische Ahr-Defizienz in Hepatozyten schützt vor hyperakuter APAP-Toxizität

Als die jeweilige Bedeutung der Ahr-Aktivierung durch ITE in myeloischen Zellen oder Hepatozyten zur APAP-induzierten Leberschädigung weiter untersucht wurde, zeigte sich, dass die Ahr-Aktivität in myeloischen Zellen insgesamt irrelevant war (Abb. 18-21), während die Ahr-Aktivierung in Hepatozyten für die Verschlimmerung der Krankheit entscheidend war (Abb. 23-27). Dies zeigte sich in einem signifikant abgeschwächten Krankheitsverlauf in Alb^{Δ/ΔAhr}-Mäusen inklusive einer verminderten Entzündungsreaktion im Vergleich zu den Wurfgeschwistern (Abb. 23, Abb. 24, Abb. 27).

Hinsichtlich des Metabolismus wurden für den APAP-Abbau in der Phase-II-Reaktion bei Alb^{Δ/ΔAhr}-Mäusen nach der kombinierten ITE- und APAP-Behandlung signifikant erhöhte Level des nicht-toxischen Metaboliten APAP-SUL detektiert, während sich für APAP-GLC kein Unterschied zeigte (Abb. 26A, 26B). Diese Ergebnisse erscheinen konträr zu den Beobachtungen bei den mit ITE und APAP behandelten WT-Mäusen (Abb. 13A, 13B). Hier können keine eindeutigen Aussagen getroffen werden, aber es liegt nahe, dass der APAP-Abbau über Glucuronosyltransferase, welcher in dem ER der Hepatozyten stattfindet [1] durch die Alb^{Δ/ΔAhr}-Defizienz auf den vermehrten Weg der Sulfatierung umgeleitet wurde, da die zugehörigen Enzyme zudem nicht mehr durch die Ahr-Ligation unterdrückt wurden. Ahr wurde in der Literatur bereits eine besondere Bedeutung bei der Glucuronidierung zugeordnet, so zeigte sich bei Ahr-Null-Mäusen eine unterdrückte Expression der Glucuronosyltransferasen UGT1A1/A6 [254]. Das beobachtete Phänomen wurde in unserer Studie nicht weiter eruiert, denn trotz dieser unklaren Ergebnisse, waren die Alb^{Δ/ΔAhr}-Mäuse im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern eindeutig vor der hyperakuten APAP-Toxizität geschützt. Da das APAP-metabolisierende Enzym Cyp1a2 ein direktes nachgeschaltetes Ziel von Ahr ist und durch ITE stark induziert wird, liegt die Vermutung nahe, dass die Produktion bioaktiver APAP-Metaboliten durch die kombinierte Behandlung mit APAP und ITE erhöht wird. Ebenso war der Schutz vor verschlimmerten Leberschäden durch die kombinierte Behandlung mit APAP und ITE bei Alb^{Δ/ΔAhr}-Mäusen hauptsächlich mit dem Fehlen der Cyp1a2-Induktion verbunden. Die Cyp2e1-Expression war dagegen im Vergleich zu Wurfgeschwisterkontrollen nicht beeinflusst (Abb. 25, Abb. 26). Somit scheint die Ahr-Cyp1a2-Achse die wichtigste mechanistische Verbindung zu sein, die für die Ahr-abhängige Verschlimmerung der APAP-induzierten Leberschäden verantwortlich ist. Dies wird durch die bereits in 4.1 erwähnten Ergebnisse bei WT-Mäusen unterstützt, ebenso durch die Ligation mit FICZ. Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Ahr-Aktivierung in Hepatozyten für das APAP-induzierte akute Leberversagen sensibilisiert, indem sie die Anhäufung von toxischen APAP-Metaboliten fördert. Bereits eine physiologische Grundaktivität von Ahr in Hepatozyten schien die APAP-Intoxikation zu intensivieren, denn die Serumtransaminasen ALT und AST waren bei Alb^{Δ/ΔAhr}-Mäusen signifikant reduziert (Abb. 22). Die in dieser Arbeit gelungene Entschlüsselung von Ahr in Hepatozyten als Verstärker des toxischen APAP-Metabolismus könnte als Grundlage für die weitere Erforschung von Ahr als therapeutisches Zielmolekül in der APAP-induzierten

Leberschädigung dienen. Hier wäre die Nutzung von spezifischen Ahr-Inhibitoren bei der APAP-Hepatotoxizität vorstellbar.

4.3 Eine Ahr-Aktivierung induziert bereits bei therapeutischen APAP-Dosen hepatozelluläre Schäden

Bereits bei therapeutischen APAP-Dosen, die für die Anwendung beim Menschen zugelassen sind, führte eine kombinierte Behandlung mit ITE in einer veröffentlichten therapeutischen und nicht-toxischen Dosis [179] zu einer signifikanten Erhöhung der Serumtransaminasen und signifikant verstärktem hepatozellulären Tod (Abb. 28). Ebenso führte die ITE-vermittelte Ahr-Aktivierung selbst bei niedriger Dosis (d. h. 1/10 der veröffentlichten therapeutischen Dosis [171, 234, 235]) zu einem signifikanten Anstieg der APAP-Hepatotoxizität, was auf eine mögliche klinische Bedeutung des Ahr-Signalwegs bei hyperakuten APAP-induzierten Leberschäden hindeutet (Abb. 29). In Hinblick auf die hier angegebenen humanen Äquivalenzdosen sollte aber auch die unterschiedliche APAP-Sensitivität der einzelnen Spezies bedacht werden, die in Mäusen als hoch eingestuft wird. Dennoch bietet die Verwendung von Mäusen als Versuchstiere das beste experimentelle Potenzial für das Verständnis der menschlichen APAP-Pathophysiologie [138, 255]. Obwohl Paracetamol global einen hohen Stellenwert als Schmerzmittel einnimmt, ist die Dosierungsempfehlung sowie die Arzneimittelkennzeichnung vage. APAP ist heutzutage nicht nur als Einzelwirkstoff erhältlich, sondern auch Bestandteil einiger Kombinationspräparate und in unterschiedlichsten Arzneimittelformulierungen vorhanden [256]. Somit ist die tatsächlich eingenommene APAP-Menge teilweise schwer einzuschätzen und zu kalkulieren. In Anbetracht des Risikos für eine Hepatotoxizität, die durch Wechselwirkung mit anderen Substanzen, wie beispielsweise Ahr-Liganden, begünstigt werden kann, sollte einerseits die leichte Zugänglichkeit von APAP überdacht sowie andererseits die Dosierungsempfehlung angepasst werden.

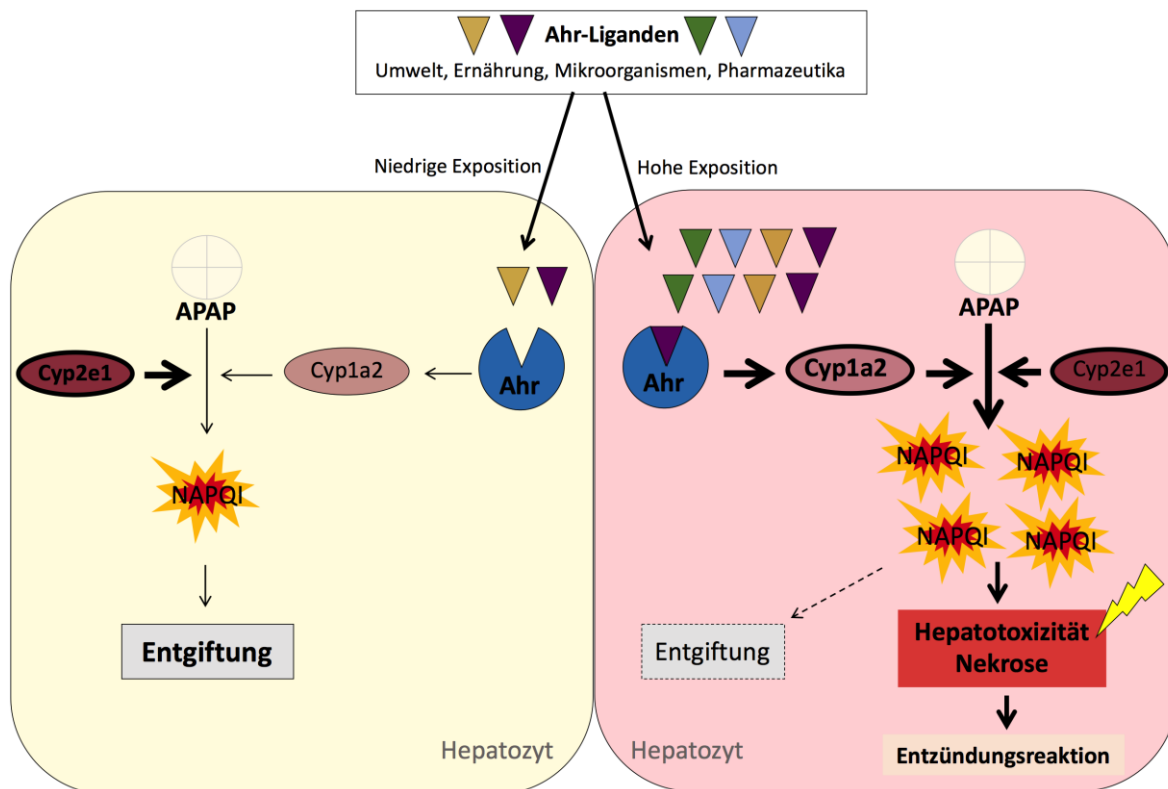


Abb. 33: Schematische Zusammenfassung der Wechselwirkungen von Ahr-Aktivierung und APAP. APAP kann eine Leberschädigung mit unterschiedlichem klinischen Ausgang verursachen. Diese Arbeit zeigt, dass die APAP-induzierte Hepatotoxizität durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Ahr verstärkt wird. Eine unterschiedliche Exposition gegenüber aktivierenden Ahr-Liganden könnte die individuelle Empfindlichkeit gegenüber APAP erklären. Modifiziert nach [257].

4.4. Schlussfolgerung und Ausblick

In Anbetracht des global vorkommenden APAP-induzierten Leberversagens sind neue therapeutische oder bestenfalls präventive Strategien dringend erforderlich. Die Behandlungsmöglichkeiten sind nach wie vor begrenzt und meist nur unterstützend. Das derzeit einzige klinisch zugelassene Medikament NAC kann von unerwünschten Wirkungen begleitet sein, darunter anaphylaktoide Reaktionen in bis zu 15 % der Fälle [50]. Auch kann die NAC-Wirksamkeit bei Patienten vermindert sein, wenn diese erst spät (ca. 10 Stunden) nach der APAP-Intoxikation behandelt werden und die Leberschädigung schon eingetreten ist. In diesen Fällen kann eine Lebertransplantation erforderlich werden, diese stellt jedoch aufgrund des Mangels an geeignetem Spendergewebe und der damit verbundenen lebenslangen Immunsuppression keine ideale therapeutische Maßnahme dar [51]. Es kann davon ausgegangen werden, dass jeder Mensch umweltbedingt und je nach Ernährung, Stoffwechselzustand oder Zusammensetzung der Mikrobiota ständig unterschiedlichen Mengen an nicht-toxischen Ahr-Liganden

ausgesetzt ist. Der mikrobielle Stoffwechsel der Aminosäure Tryptophan ist beispielweise als Quelle für die Erzeugung einer Reihe von Ahr-Liganden bekannt und auch die hepatische Aufnahme und der Metabolismus von Indol ist eine weitere Quelle für die Bildung von affinen Ahr-Liganden. Auch kann die Ahr-Grundaktivität in einem Organismus durch endogen erzeugte Antagonisten oder selektive Modulatoren beeinflusst werden, die möglicherweise noch nicht charakterisiert wurden [189]. Es wird angenommen, dass das Mikrobiom an der Entstehung zahlreicher Krankheiten beteiligt ist und ebenso der Gehalt an mikrobiellen Ahr-Agonisten zu Krankheitspathologien beiträgt [143, 258-260]. Es ist also wahrscheinlich, dass eine Dysbiose mit Veränderungen der von den Darmbakterien stammenden Metaboliten, einschließlich der Ahr-Liganden, einhergeht. Dies könnte von klinischer Relevanz sein, denn die Daten dieser Arbeit zeigen, dass die Ahr-Aktivierung selbst bei APAP-Dosen im therapeutischen Bereich zum hepatozellulären Tod führte. Ebenso zeigen unsere Daten, dass Vorsicht geboten ist, wenn Ahr-Liganden in Kombination mit APAP verwendet werden. Zur klinischen Behandlung von Multiple Sklerose, Psoriasis und atopischer Dermatitis wurden bereits Ahr-gerichtete Medikamente wie Laquinimod [261] und Tapinarof [262-264] entwickelt [265]. Eine wichtige Herausforderung für die therapeutische Ahr-Adressierung besteht allerdings nach wie vor darin, die Ahr-Liganden gezielt in die gewünschten Gewebe und Zellen einzubringen und dabei die Ahr-Modulation in anderen Geweben zu minimieren. Insbesondere die spezifische Ausrichtung von tolerogen wirkendem ITE auf Antigen-präsentierende DCs, wie sie *in vivo* durch die gezielte Verabreichung immunmodulatorischer Moleküle mit Nanopartikeln bei Multiple Sklerose und Typ-1-Diabetes [171, 227, 234] erreicht wurde, scheint ein vielversprechender Ansatz für eine sichere und gezielte therapeutische Intervention bei Entzündungskrankheiten zu sein. In dieser Arbeit wurde auf zellulärer Ebene entschlüsselt, dass die Ahr-Aktivierung in Hepatozyten für ein APAP-induziertes akutes Leberversagen sensibilisiert, somit wäre eine gezielte Ahr-Suppression in Hepatozyten mit Nano-Pharmazeutika denkbar. Perspektivisch könnten beispielsweise Nanopartikel mit „small interfering“ RNA (siRNA) zur Unterdrückung der Ahr-Genexpression oder mit anderen therapeutischen Ahr-Inhibitoren beladen und zur Anwendung gebracht werden. Methodisch könnten hier Lipid-Nanopartikel eingesetzt werden, um die Partikel an den LSECS vorbei an den zellulären Ort ihrer beabsichtigten therapeutischen Wirkung, den Hepatozyten, zu bringen. [266-268]. Eine zielgerichtete Ahr-Suppression könnte ebenfalls mit Gentherapievektoren anhand von intravenös verabreichten rekombinanten

adeno-assoziierten Viren (rAAV) als Plattform für die Übertragung von Transgenen in die Leber erreicht werden [269]. Die Verwendung von Ahr-basierten Therapien auf der Grundlage von Präbiotika oder Metaboliten aus probiotischen Bakterien, stellt aktuell noch keine ausreichend evaluierte und sichere therapeutische Behandlungsoption für APAP-induziertes Leberversagen dar. Es sollte berücksichtigt werden, dass Ahr an zahlreichen physiologischen Prozessen beteiligt ist und die Ahr-Liganden unterschiedliche Quellen und Strukturen haben, verschiedene Halbwertszeiten und Rezeptoraffinitäten aufweisen und unterschiedliche nachgeschaltete Signaltransduktions-Wirkungen haben. Die therapeutische Ahr-Ausrichtung erfordert dementsprechend ein detailliertes Verständnis der Regulationsmechanismen, die den hepatischen Immunreaktionen sowie dem Metabolismus und möglichen Wechselwirkungen zugrunde liegen, und auch der Beziehung zwischen Wirt und Mikrobiom. Ob ein Ligand in einer bestimmten Situation vorteilhaft oder nachteilig ist, muss umfassend ermittelt werden. Bei den einzelnen Ahr-Liganden sind, wie bei allen vielversprechenden neuen Arzneimitteln, umfassende Sicherheitstests unter therapeutischen Bedingungen erforderlich, um festzustellen, ob eine chronische Ahr-Aktivierung zu unerwünschten Wirkungen führt. Als präventive Maßnahmen in Hinblick auf den APAP-Konsum scheinen in erster Linie ein Achtsamkeitsbasiertes-Management, eine personalisierte Arzneimitteltherapie und die interdisziplinäre Zusammenarbeit der richtige Weg zu sein. Die Beteiligung des Ahr an der APAP-Hepatotoxizität wirft zudem neue Forschungsfragen auf. Zwar wurde wiederholt nachgewiesen, dass das mikrobielle Ökosystem die Leberphysiologie und den APAP-Metabolismus [127-135, 270] beeinflusst, doch nach wie vor ist nur wenig über die zellulären und molekularen modulatorischen Funktionen bekannt. So sollte der kontextspezifische Beitrag verschiedener Kommensalen und ihrer Metaboliten auf die Ahr-abhängige Gensignatur und auf die APAP-induzierte Leberschädigung aufgedeckt werden. Unser Verständnis der Ahr-Aktivierung bei einer Leberschädigung bleibt vorerst begrenzt und wird sich durch künftige Forschungsbemühungen und die Entwicklung und Verfeinerung von Technologien verbessern. Bis dahin sollten wir die unbedachte Einnahme von APAP und auch die therapeutische Ahr-Modulation kritisch bewerten.

5. Literatur

1. Zatloukal, K., M. Schwab, and H. Denk, *Anatomie und Funktion der Leber*, in *Pathologie: Leber, Gallenwege und Pankreas*, A. Tannapfel and G. Klöppel, Editors. 2020, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 3-13.
2. Manns, M.P., N. Cieplik, and S. Schneidewind, *Anatomie der Leber*, in *Praxis der Hepatologie*, M.P. Manns and S. Schneidewind, Editors. 2016, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 3-7.
3. Munding, J. and A. Tannapfel, *Anatomie der Leber*. *Der Radiologe*, 2011. **51**(8): p. 655.
4. Roskams, T., V. Desmet, and C. Verslype, *Development, structure and function of the liver In: Burt AD, Portmann BC, Ferrell LD, eds. MacSween's Pathology of the Liver. Edingurgh, UK: Churchill Livingstone. 2007, Elsevier.*
5. Torre, C., C. Perret, and S. Colnot, *Molecular determinants of liver zonation*. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2010. **97**: p. 127-50.
6. Jenne, C.N. and P. Kubes, *Immune surveillance by the liver*. *Nat Immunol*, 2013. **14**(10): p. 996-1006.
7. Carambia, A. and J. Herkel, *Dietary and metabolic modulators of hepatic immunity*. *Semin Immunopathol*, 2018. **40**(2): p. 175-188.
8. Wisse, E., et al., *The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse*. *Hepatology*, 1985. **5**(4): p. 683-92.
9. Ben-Moshe, S. and S. Itzkovitz, *Spatial heterogeneity in the mammalian liver*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019. **16**(7): p. 395-410.
10. Gebhardt, R., *Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function*. *Pharmacol Ther*, 1992. **53**(3): p. 275-354.
11. Gebhardt, R. and M. Matz-Soja, *Liver zonation: Novel aspects of its regulation and its impact on homeostasis*. *World J Gastroenterol*, 2014. **20**(26): p. 8491-504.
12. Trefts, E., M. Gannon, and D.H. Wasserman, *The liver*. *Curr Biol*, 2017. **27**(21): p. R1147-R1151.
13. Halpern, K.B., et al., *Single-cell spatial reconstruction reveals global division of labour in the mammalian liver*. *Nature*, 2017. **542**(7641): p. 352-356.
14. Kater, J.M., *Comparative and experimental studies on the cytology of the liver*. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 1933. **17**: p. 217-246.
15. Deane, H.W., *A cytological study of the diurnal cycle of the liver of the mouse in relation to storage and secretion*. *The Anatomical Record*, 1944. **88**(1): p. 39-65.
16. Tujios, S. and R.J. Fontana, *Mechanisms of drug-induced liver injury: from bedside to bench*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011. **8**(4): p. 202-11.

17. Nelson, S.D., *Molecular mechanisms of the hepatotoxicity caused by acetaminophen*. Semin Liver Dis, 1990. **10**(4): p. 267-78.
18. Makin, A.J., J. Wendon, and R. Williams, *A 7-year experience of severe acetaminophen-induced hepatotoxicity (1987-1993)*. Gastroenterology, 1995. **109**(6): p. 1907-16.
19. Anundi, I., et al., *Zonation of acetaminophen metabolism and cytochrome P450 2E1-mediated toxicity studied in isolated periportal and perivenous hepatocytes*. Biochem Pharmacol, 1993. **45**(6): p. 1251-9.
20. Roberts, M.S., et al., *Enterohepatic circulation: physiological, pharmacokinetic and clinical implications*. Clin Pharmacokinet, 2002. **41**(10): p. 751-90.
21. Tripathi, A., et al., *The gut-liver axis and the intersection with the microbiome*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018. **15**(7): p. 397-411.
22. Ringseis, R., D.K. Gessner, and K. Eder, *The Gut-Liver Axis in the Control of Energy Metabolism and Food Intake in Animals*. Annu Rev Anim Biosci, 2020. **8**: p. 295-319.
23. Konturek, P.C., et al., *Leber-Darm-Achse: Wie Darmbakterien die Leber beeinflussen*. MMW-Fortschritte der Medizin, 2018. **160**(5): p. 11-15.
24. Albillos, A., A. de Gottardi, and M. Rescigno, *The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy*. J Hepatol, 2020. **72**(3): p. 558-577.
25. Heymann, F. and F. Tacke, *Immunology in the liver--from homeostasis to disease*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2016. **13**(2): p. 88-110.
26. Blesl, A. and V. Stadlbauer, *The Gut-Liver Axis in Cholestatic Liver Diseases*. Nutrients, 2021. **13**(3): p. 1018.
27. Zeuzem, S., *Gut-liver axis*. International journal of colorectal disease, 2000. **15**(2): p. 59-82.
28. Collins, S.L. and A.D. Patterson, *The gut microbiome: an orchestrator of xenobiotic metabolism*. Acta Pharm Sin B, 2020. **10**(1): p. 19-32.
29. Dempsey, J.L. and J.Y. Cui, *Microbiome is a functional modifier of P450 drug metabolism*. Curr Pharmacol Rep, 2019. **5**(6): p. 481-490.
30. Kubes, P. and C. Jenne, *Immune Responses in the Liver*. Annu Rev Immunol, 2018. **36**: p. 247-277.
31. Crispe, I.N., *Hepatic T cells and liver tolerance*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(1): p. 51-62.
32. Thomson, A.W. and P.A. Knolle, *Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(11): p. 753-66.
33. Herkel, J., A. Carambia, and A.W. Lohse, *Autoimmune hepatitis: Possible triggers, potential treatments*. J Hepatol, 2020. **73**(2): p. 446-448.

34. Lee, W.M., *Acetaminophen-related acute liver failure in the United States*. Hepatol Res, 2008. **38 Suppl 1**: p. S3-8.
35. Yoon, E., et al., *Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity: a Comprehensive Update*. J Clin Transl Hepatol, 2016. **4(2)**: p. 131-42.
36. Ramachandran, A. and H. Jaeschke, *Acetaminophen Toxicity: Novel Insights Into Mechanisms and Future Perspectives*. Gene Expr, 2018. **18(1)**: p. 19-30.
37. Athersuch, T.J., et al., *Paracetamol metabolism, hepatotoxicity, biomarkers and therapeutic interventions: a perspective*. Toxicol Res (Camb), 2018. **7(3)**: p. 347-357.
38. Larson, A.M., et al., *Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study*. Hepatology, 2005. **42(6)**: p. 1364-72.
39. Bernal, W. and J. Wendon, *Acute liver failure*. N Engl J Med, 2013. **369(26)**: p. 2525-34.
40. Gulmez, S.E., et al., *Transplantation for acute liver failure in patients exposed to NSAIDs or paracetamol (acetaminophen): the multinational case-population SALT study*. Drug Saf, 2013. **36(2)**: p. 135-44.
41. Dong, V., R. Nanchal, and C.J. Karvellas, *Pathophysiology of Acute Liver Failure*. Nutr Clin Pract, 2020. **35(1)**: p. 24-29.
42. Herndon, C.M. and D.M. Dankenbring, *Patient perception and knowledge of acetaminophen in a large family medicine service*. J Pain Palliat Care Pharmacother, 2014. **28(2)**: p. 109-16.
43. Bernal, W., et al., *Lessons from look-back in acute liver failure? A single centre experience of 3300 patients*. J Hepatol, 2013. **59(1)**: p. 74-80.
44. Simoes, C., et al., *Epidemiology of Acute Liver Failure from a Regional Liver Transplant Center in Portugal*. GE Port J Gastroenterol, 2018. **26(1)**: p. 33-39.
45. Rotundo, L. and N. Pirsopoulos, *Liver injury induced by paracetamol and challenges associated with intentional and unintentional use*. World J Hepatol, 2020. **12(4)**: p. 125-136.
46. Clark, R., et al., *Population prevalence of high dose paracetamol in dispensed paracetamol/opioid prescription combinations: an observational study*. BMC Clin Pharmacol, 2012. **12**: p. 11.
47. Bailey, B., D.K. Amre, and P. Gaudreault, *Fulminant hepatic failure secondary to acetaminophen poisoning: a systematic review and meta-analysis of prognostic criteria determining the need for liver transplantation*. Crit Care Med, 2003. **31(1)**: p. 299-305.
48. Nourjah, P., et al., *Estimates of acetaminophen (Paracetamol)-associated overdoses in the United States*. Pharmacoepidemiol Drug Saf, 2006. **15(6)**: p. 398-405.

49. Kwo, P.Y., S.M. Cohen, and J.K. Lim, *ACG Clinical Guideline: Evaluation of Abnormal Liver Chemistries*. *Am J Gastroenterol*, 2017. **112**(1): p. 18-35.
50. Kolodziejczyk, A.A., et al., *Acute liver failure is regulated by MYC-and microbiome-dependent programs*. *Nature medicine*, 2020. **26**(12): p. 1899-1911.
51. Starkey Lewis, P., et al., *Alternatively activated macrophages promote resolution of necrosis following acute liver injury*. *J Hepatol*, 2020. **73**(2): p. 349-360.
52. Corsini, A. and M. Bortolini, *Drug-induced liver injury: the role of drug metabolism and transport*. *J Clin Pharmacol*, 2013. **53**(5): p. 463-74.
53. Almazroo, O.A., M.K. Miah, and R. Venkataramanan, *Drug Metabolism in the Liver*. *Clin Liver Dis*, 2017. **21**(1): p. 1-20.
54. Yan, M., et al., *Mechanisms of acetaminophen-induced liver injury and its implications for therapeutic interventions*. *Redox Biol*, 2018. **17**: p. 274-283.
55. Ramachandran, A. and H. Jaeschke, *Mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity and their translation to the human pathophysiology*. *J Clin Transl Res*, 2017. **3**(Suppl 1): p. 157-169.
56. McGill, M.R. and H. Jaeschke, *Metabolism and disposition of acetaminophen: recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis*. *Pharm Res*, 2013. **30**(9): p. 2174-87.
57. Mittal, B., et al., *Cytochrome P450 in Cancer Susceptibility and Treatment*. *Adv Clin Chem*, 2015. **71**: p. 77-139.
58. Jaeschke, H., M.R. McGill, and A. Ramachandran, *Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity*. *Drug Metab Rev*, 2012. **44**(1): p. 88-106.
59. Jaeschke, H., et al., *Acetaminophen hepatotoxicity and repair: the role of sterile inflammation and innate immunity*. *Liver Int*, 2012. **32**(1): p. 8-20.
60. Yang, X., et al., *The Gut-liver Axis in Immune Remodeling: New insight into Liver Diseases*. *Int J Biol Sci*, 2020. **16**(13): p. 2357-2366.
61. McGill, M.R., et al., *The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(4): p. 1574-83.
62. Jaeschke, H. and M.R. McGill, *Cytochrome P450-derived versus mitochondrial oxidant stress in acetaminophen hepatotoxicity*. *Toxicol Lett*, 2015. **235**(3): p. 216-7.
63. Du, K., A. Ramachandran, and H. Jaeschke, *Oxidative stress during acetaminophen hepatotoxicity: Sources, pathophysiological role and therapeutic potential*. *Redox Biol*, 2016. **10**: p. 148-156.

64. Iorga, A. and L. Dara, *Cell death in drug-induced liver injury*. Adv Pharmacol, 2019. **85**: p. 31-74.
65. Zaher, H., et al., *Protection against acetaminophen toxicity in CYP1A2 and CYP2E1 double-null mice*. Toxicol Appl Pharmacol, 1998. **152**(1): p. 193-9.
66. Sezgin, S., et al., *Spatio-temporal visualization of the distribution of acetaminophen as well as its metabolites and adducts in mouse livers by MALDI MSI*. Arch Toxicol, 2018. **92**(9): p. 2963-2977.
67. Smith, A.K., et al., *Competing Mechanistic Hypotheses of Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity Challenged by Virtual Experiments*. PLoS Comput Biol, 2016. **12**(12): p. e1005253.
68. Iorga, A., L. Dara, and N. Kaplowitz, *Drug-Induced Liver Injury: Cascade of Events Leading to Cell Death, Apoptosis or Necrosis*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(5).
69. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicol Pathol, 2007. **35**(4): p. 495-516.
70. Shehu, A.I., X. Ma, and R. Venkataramanan, *Mechanisms of Drug-Induced Hepatotoxicity*. Clin Liver Dis, 2017. **21**(1): p. 35-54.
71. Galluzzi, L., et al., *Cell death modalities: classification and pathophysiological implications*. Cell Death Differ, 2007. **14**(7): p. 1237-43.
72. McIlwain, D.R., T. Berger, and T.W. Mak, *Caspase functions in cell death and disease*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(4): p. a008656.
73. Liu, P.F., et al., *Expression levels of cleaved caspase-3 and caspase-3 in tumorigenesis and prognosis of oral tongue squamous cell carcinoma*. PLoS One, 2017. **12**(7): p. e0180620.
74. Imaeda, A.B., et al., *Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome*. J Clin Invest, 2009. **119**(2): p. 305-14.
75. Antoine, D.J., et al., *RETRACTED: Molecular forms of HMGB1 and keratin-18 as mechanistic biomarkers for mode of cell death and prognosis during clinical acetaminophen hepatotoxicity*. J Hepatol, 2012. **56**(5): p. 1070-1079.
76. Woolbright, B.L. and H. Jaeschke, *The impact of sterile inflammation in acute liver injury*. J Clin Transl Res, 2017. **3**(Suppl 1): p. 170-188.
77. Woolbright, B.L. and H. Jaeschke, *Role of the inflammasome in acetaminophen-induced liver injury and acute liver failure*. J Hepatol, 2017. **66**(4): p. 836-848.
78. Jaeschke, H., C. Cover, and M.L. Bajt, *Role of caspases in acetaminophen-induced liver injury*. Life Sci, 2006. **78**(15): p. 1670-6.
79. Jaeschke, H., C.D. Williams, and A. Farhood, *No evidence for caspase-dependent apoptosis in acetaminophen hepatotoxicity*. Hepatology, 2011. **53**(2): p. 718-719.

80. Gujral, J.S., et al., *Mode of cell death after acetaminophen overdose in mice: apoptosis or oncotic necrosis?* Toxicol Sci, 2002. **67**(2): p. 322-8.
81. Williams, C.D., A. Farhood, and H. Jaeschke, *Role of caspase-1 and interleukin-1beta in acetaminophen-induced hepatic inflammation and liver injury.* Toxicol Appl Pharmacol, 2010. **247**(3): p. 169-78.
82. Kon, K., et al., *Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes.* Hepatology, 2004. **40**(5): p. 1170-9.
83. Jaeschke, H., J.S. Gujral, and M.L. Bajt, *Apoptosis and necrosis in liver disease.* Liver Int, 2004. **24**(2): p. 85-9.
84. Jacob, M., H.G. Mannherz, and M. Napirei, *Chromatin breakdown by deoxyribonuclease1 promotes acetaminophen-induced liver necrosis: an ultrastructural and histochemical study on male CD-1 mice.* Histochem Cell Biol, 2007. **128**(1): p. 19-33.
85. Antoniadis, C.G., et al., *Source and characterization of hepatic macrophages in acetaminophen-induced acute liver failure in humans.* Hepatology, 2012. **56**(2): p. 735-46.
86. Dahlin, D.C., et al., *N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(5): p. 1327-31.
87. Krenkel, O., J.C. Mossanen, and F. Tacke, *Immune mechanisms in acetaminophen-induced acute liver failure.* Hepatobiliary Surg Nutr, 2014. **3**(6): p. 331-43.
88. Kubes, P. and W.Z. Mehal, *Sterile inflammation in the liver.* Gastroenterology, 2012. **143**(5): p. 1158-1172.
89. Guo, H., J.B. Callaway, and J.P. Ting, *Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics.* Nat Med, 2015. **21**(7): p. 677-87.
90. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, *The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta.* Mol Cell, 2002. **10**(2): p. 417-26.
91. Martin-Murphy, B.V., M.P. Holt, and C. Ju, *The role of damage associated molecular pattern molecules in acetaminophen-induced liver injury in mice.* Toxicol Lett, 2010. **192**(3): p. 387-94.
92. Fisher, J.E., et al., *Role of Kupffer cells and toll-like receptor 4 in acetaminophen-induced acute liver failure.* J Surg Res, 2013. **180**(1): p. 147-55.
93. Ju, C., et al., *Protective role of Kupffer cells in acetaminophen-induced hepatic injury in mice.* Chem Res Toxicol, 2002. **15**(12): p. 1504-13.
94. Karlmark, K.R., et al., *Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis.* Hepatology, 2009. **50**(1): p. 261-74.

95. Holt, M.P., L. Cheng, and C. Ju, *Identification and characterization of infiltrating macrophages in acetaminophen-induced liver injury*. J Leukoc Biol, 2008. **84**(6): p. 1410-21.
96. Wehr, A., et al., *Chemokine receptor CXCR6-dependent hepatic NK T Cell accumulation promotes inflammation and liver fibrosis*. J Immunol, 2013. **190**(10): p. 5226-36.
97. Crown, S.E., et al., *Heterodimerization of CCR2 chemokines and regulation by glycosaminoglycan binding*. J Biol Chem, 2006. **281**(35): p. 25438-46.
98. Dambach, D.M., et al., *Role of CCR2 in macrophage migration into the liver during acetaminophen-induced hepatotoxicity in the mouse*. Hepatology, 2002. **35**(5): p. 1093-103.
99. Zigmond, E., et al., *Infiltrating monocyte-derived macrophages and resident kupffer cells display different ontogeny and functions in acute liver injury*. J Immunol, 2014. **193**(1): p. 344-53.
100. Al-Belooshi, T., et al., *Increased mitochondrial stress and modulation of mitochondrial respiratory enzyme activities in acetaminophen-induced toxicity in mouse macrophage cells*. Food Chem Toxicol, 2010. **48**(10): p. 2624-32.
101. Tacke, F. and H.W. Zimmermann, *Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis*. J Hepatol, 2014. **60**(5): p. 1090-6.
102. Ehling, J., et al., *CCL2-dependent infiltrating macrophages promote angiogenesis in progressive liver fibrosis*. Gut, 2014. **63**(12): p. 1960-1971.
103. You, Q., et al., *Role of hepatic resident and infiltrating macrophages in liver repair after acute injury*. Biochem Pharmacol, 2013. **86**(6): p. 836-43.
104. Ramachandran, P., et al., *Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(46): p. E3186-95.
105. Dal-Secco, D., et al., *A dynamic spectrum of monocytes arising from the in situ reprogramming of CCR2+ monocytes at a site of sterile injury*. J Exp Med, 2015. **212**(4): p. 447-56.
106. Plitas, G., et al., *Dendritic cells are required for effective cross-presentation in the murine liver*. Hepatology, 2008. **47**(4): p. 1343-51.
107. Marques, P.E., et al., *Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to amplify organ injury during mouse acute liver failure*. Hepatology, 2012. **56**(5): p. 1971-82.
108. Huebener, P., et al., *The HMGB1/RAGE axis triggers neutrophil-mediated injury amplification following necrosis*. J Clin Invest, 2015. **125**(2): p. 539-50.

109. Moles, A., et al., *A TLR2/S100A9/CXCL-2 signaling network is necessary for neutrophil recruitment in acute and chronic liver injury in the mouse.* J Hepatol, 2014. **60**(4): p. 782-91.
110. Tinel, M., et al., *Subliminal Fas stimulation increases the hepatotoxicity of acetaminophen and bromobenzene in mice.* Hepatology, 2004. **39**(3): p. 655-66.
111. Tacke, F., T. Luedde, and C. Trautwein, *Inflammatory pathways in liver homeostasis and liver injury.* Clin Rev Allergy Immunol, 2009. **36**(1): p. 4-12.
112. Wang, H., et al., *Invariant NKT cell activation induces neutrophil accumulation and hepatitis: opposite regulation by IL-4 and IFN-gamma.* Hepatology, 2013. **58**(4): p. 1474-85.
113. Martin-Murphy, B.V., et al., *Increased susceptibility of natural killer T-cell-deficient mice to acetaminophen-induced liver injury.* Hepatology, 2013. **57**(4): p. 1575-84.
114. Charles, R., et al., *Human hepatic stellate cells inhibit T-cell response through B7-H1 pathway.* Transplantation, 2013. **96**(1): p. 17-24.
115. Heard, K., et al., *A randomized, placebo-controlled trial to determine the course of aminotransferase elevation during prolonged acetaminophen administration.* BMC Pharmacol Toxicol, 2014. **15**: p. 39.
116. Bunchorntavakul, C. and K.R. Reddy, *Acetaminophen-related hepatotoxicity.* Clin Liver Dis, 2013. **17**(4): p. 587-607, viii.
117. Wang, P., et al., *Isoniazid metabolism and hepatotoxicity.* Acta Pharm Sin B, 2016. **6**(5): p. 384-392.
118. Xu, S., et al., *2,3,4',5-tetrahydroxystilbene-2-O-beta-D-glucoside exacerbates acetaminophen-induced hepatotoxicity by inducing hepatic expression of CYP2E1, CYP3A4 and CYP1A2.* Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 16511.
119. Abebe, W., *Herbal medication: potential for adverse interactions with analgesic drugs.* J Clin Pharm Ther, 2002. **27**(6): p. 391-401.
120. Jaeschke, H., et al., *Herbal extracts as hepatoprotectants against acetaminophen hepatotoxicity.* World J Gastroenterol, 2010. **16**(19): p. 2448-50.
121. Jiang, Y., et al., *Schisandrol B protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity by inhibition of CYP-mediated bioactivation and regulation of liver regeneration.* Toxicol Sci, 2015. **143**(1): p. 107-15.
122. Zhao, P. and J.T. Slattery, *Effects of ethanol dose and ethanol withdrawal on rat liver mitochondrial glutathione: implication of potentiated acetaminophen toxicity in alcoholics.* Drug Metab Dispos, 2002. **30**(12): p. 1413-7.
123. Dart, R.C., et al., *Acetaminophen poisoning: an evidence-based consensus guideline for out-of-hospital management.* Clin Toxicol (Phila), 2006. **44**(1): p. 1-18.

124. Schmidt, L.E., K. Dalhoff, and H.E. Poulsen, *Acute versus chronic alcohol consumption in acetaminophen-induced hepatotoxicity*. *Hepatology*, 2002. **35**(4): p. 876-82.
125. Yuan, L. and N. Kaplowitz, *Mechanisms of drug-induced liver injury*. *Clin Liver Dis*, 2013. **17**(4): p. 507-18, vii.
126. Whitcomb, D.C. and G.D. Block, *Association of acetaminophen hepatotoxicity with fasting and ethanol use*. *JAMA*, 1994. **272**(23): p. 1845-50.
127. Dey, P., *The role of gut microbiome in chemical-induced metabolic and toxicological murine disease models*. *Life Sci*, 2020. **258**: p. 118172.
128. Cho, S., et al., *Fructose diet alleviates acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice*. *PLoS One*, 2017. **12**(8): p. e0182977.
129. Gong, S., et al., *Gut microbiota mediates diurnal variation of acetaminophen induced acute liver injury in mice*. *J Hepatol*, 2018. **69**(1): p. 51-59.
130. Jourova, L., et al., *Gut Microbiome Alters the Activity of Liver Cytochromes P450 in Mice With Sex-Dependent Differences*. *Front Pharmacol*, 2020. **11**: p. 01303.
131. Chen, T., R. Li, and P. Chen, *Gut Microbiota and Chemical-Induced Acute Liver Injury*. *Front Physiol*, 2021. **12**: p. 688780.
132. Kim, J.-K., et al., *Effect of probiotics on pharmacokinetics of orally administered acetaminophen in mice*. *Drug Metabolism and Disposition*, 2018. **46**(2): p. 122-130.
133. Zheng, N., et al., *Vancomycin pretreatment attenuates acetaminophen-induced liver injury through 2-hydroxybutyric acid*. *J Pharm Anal*, 2020. **10**(6): p. 560-570.
134. Schneider, K.M., et al., *Intestinal Dysbiosis Amplifies Acetaminophen-Induced Acute Liver Injury*. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2021. **11**(4): p. 909-933.
135. Elinav, E., et al., *NLRP6 and Dysbiosis: Avoiding the Luring Attraction of Over-Simplification*. *Immunity*, 2018. **48**(4): p. 603-604.
136. Niu, M., et al., *Intestinal epithelial chemokine (CC motif) ligand 7 overexpression enhances acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice*. *The American journal of pathology*, 2020. **190**(1): p. 57-67.
137. Caparrotta, T.M., D.J. Antoine, and J.W. Dear, *Are some people at increased risk of paracetamol-induced liver injury? A critical review of the literature*. *Eur J Clin Pharmacol*, 2018. **74**(2): p. 147-160.
138. Mossanen, J.C. and F. Tacke, *Acetaminophen-induced acute liver injury in mice*. *Lab Anim*, 2015. **49**(1 Suppl): p. 30-6.
139. Du, K., et al., *Lower susceptibility of female mice to acetaminophen hepatotoxicity: Role of mitochondrial glutathione, oxidant stress and c-jun N-terminal kinase*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014. **281**(1): p. 58-66.

140. Critchley, J.A., et al., *Inter-subject and ethnic differences in paracetamol metabolism*. Br J Clin Pharmacol, 1986. **22**(6): p. 649-57.
141. Ueshima, Y., et al., *Acetaminophen metabolism in patients with different cytochrome P-4502E1 genotypes*. Alcohol Clin Exp Res, 1996. **20**(1 Suppl): p. 25A-28A.
142. Chowdhary, V., et al., *miRNA-122 Protects Mice and Human Hepatocytes from Acetaminophen Toxicity by Regulating Cytochrome P450 Family 1 Subfamily A Member 2 and Family 2 Subfamily E Member 1 Expression*. Am J Pathol, 2017. **187**(12): p. 2758-2774.
143. Rothhammer, V. and F.J. Quintana, *The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2019. **19**(3): p. 184-197.
144. Hahn, M.E., *Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution*. Chem Biol Interact, 2002. **141**(1-2): p. 131-60.
145. Esser, C. and A. Rannug, *The aryl hydrocarbon receptor in barrier organ physiology, immunology, and toxicology*. Pharmacol Rev, 2015. **67**(2): p. 259-79.
146. Quintana, F.J. and D.H. Sherr, *Aryl hydrocarbon receptor control of adaptive immunity*. Pharmacol Rev, 2013. **65**(4): p. 1148-61.
147. Shinde, R. and T.L. McGaha, *The Aryl Hydrocarbon Receptor: Connecting Immunity to the Microenvironment*. Trends Immunol, 2018. **39**(12): p. 1005-1020.
148. Legraverend, C., et al., *Regulatory gene product of the Ah locus. Characterization of receptor mutants among mouse hepatoma clones*. J Biol Chem, 1982. **257**(11): p. 6402-7.
149. Mimura, J. and Y. Fujii-Kuriyama, *Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1619**(3): p. 263-8.
150. Gutierrez-Vazquez, C. and F.J. Quintana, *Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor*. Immunity, 2018. **48**(1): p. 19-33.
151. Cella, M. and M. Colonna, *Aryl hydrocarbon receptor: Linking environment to immunity*. Semin Immunol, 2015. **27**(5): p. 310-4.
152. Murray, I.A., A.D. Patterson, and G.H. Perdew, *Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(12): p. 801-14.
153. Stockinger, B., et al., *The aryl hydrocarbon receptor: multitasking in the immune system*. Annu Rev Immunol, 2014. **32**: p. 403-32.
154. McIntosh, B.E., J.B. Hogenesch, and C.A. Bradfield, *Mammalian Per-Arnt-Sim proteins in environmental adaptation*. Annu Rev Physiol, 2010. **72**: p. 625-45.
155. Antonsson, C., et al., *Distinct roles of the molecular chaperone hsp90 in modulating dioxin receptor function via the basic helix-loop-helix and PAS domains*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(2): p. 756-65.

156. Kazlauskas, A., L. Poellinger, and I. Pongratz, *Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(19): p. 13519-13524.
157. Meyer, B.K. and G.H. Perdew, *Characterization of the AhR-hsp90-XAP2 core complex and the role of the immunophilin-related protein XAP2 in AhR stabilization*. Biochemistry, 1999. **38**(28): p. 8907-17.
158. Nguyen, P.M., et al., *p23 co-chaperone protects the aryl hydrocarbon receptor from degradation in mouse and human cell lines*. Biochem Pharmacol, 2012. **84**(6): p. 838-50.
159. Yao, E.F. and M.S. Denison, *DNA sequence determinants for binding of transformed Ah receptor to a dioxin-responsive enhancer*. Biochemistry, 1992. **31**(21): p. 5060-7.
160. Swanson, H.I., K. Tullis, and M.S. Denison, *Binding of transformed Ah receptor complex to a dioxin responsive transcriptional enhancer: evidence for two distinct heteromeric DNA-binding forms*. Biochemistry, 1993. **32**(47): p. 12841-9.
161. Denison, M.S., J.M. Fisher, and J.P. Whitlock, *Inducible, receptor-dependent protein-DNA interactions at a dioxin-responsive transcriptional enhancer*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1988. **85**(8): p. 2528-2532.
162. Denison, M.S. and S.R. Nagy, *Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2003. **43**: p. 309-34.
163. Strom, D.K., H. Postlind, and R.H. Tukey, *Characterization of the rabbit CYP1A1 and CYP1A2 genes: developmental and dioxin-inducible expression of rabbit liver P4501A1 and P4501A2*. Arch Biochem Biophys, 1992. **294**(2): p. 707-16.
164. Rowlands, J.C. and J.A. Gustafsson, *Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction*. Crit Rev Toxicol, 1997. **27**(2): p. 109-34.
165. Zhang, L., et al., *Characterization of the mouse Cyp1B1 gene. Identification of an enhancer region that directs aryl hydrocarbon receptor-mediated constitutive and induced expression*. J Biol Chem, 1998. **273**(9): p. 5174-83.
166. Nukaya, M., S. Moran, and C.A. Bradfield, *The role of the dioxin-responsive element cluster between the Cyp1a1 and Cyp1a2 loci in aryl hydrocarbon receptor biology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(12): p. 4923-8.
167. Sakurai, S., T. Shimizu, and U. Ohto, *The crystal structure of the AhRR-ARNT heterodimer reveals the structural basis of the repression of AhR-mediated transcription*. J Biol Chem, 2017. **292**(43): p. 17609-17616.
168. Mascanfroni, I.D., et al., *Metabolic control of type 1 regulatory T cell differentiation by AHR and HIF1-alpha*. Nat Med, 2015. **21**(6): p. 638-46.
169. Ohtake, F., et al., *Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor*. Nature, 2003. **423**(6939): p. 545-50.

170. Hankinson, O., *Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor*. Arch Biochem Biophys, 2005. **433**(2): p. 379-86.
171. Yeste, A., et al., *Tolerogenic nanoparticles inhibit T cell-mediated autoimmunity through SOCS2*. Sci Signal, 2016. **9**(433): p. ra61.
172. McBerry, C., et al., *SOCS2-induced proteasome-dependent TRAF6 degradation: a common anti-inflammatory pathway for control of innate immune responses*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e38384.
173. Wilson, S.R., A.D. Joshi, and C.J. Elferink, *The tumor suppressor Kruppel-like factor 6 is a novel aryl hydrocarbon receptor DNA binding partner*. J Pharmacol Exp Ther, 2013. **345**(3): p. 419-29.
174. Vogel, C.F., et al., *RelB, a new partner of aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription*. Mol Endocrinol, 2007. **21**(12): p. 2941-55.
175. Vogel, C.F., et al., *Cross-talk between aryl hydrocarbon receptor and the inflammatory response: a role for nuclear factor- κ B*. Journal of Biological Chemistry, 2014. **289**(3): p. 1866-1875.
176. Salisbury, R.L. and C.E. Sulentic, *The AhR and NF-kappaB/Rel Proteins Mediate the Inhibitory Effect of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin on the 3' Immunoglobulin Heavy Chain Regulatory Region*. Toxicol Sci, 2015. **148**(2): p. 443-59.
177. Iu, M., et al., *RelB attenuates cigarette smoke extract-induced apoptosis in association with transcriptional regulation of the aryl hydrocarbon receptor*. Free Radic Biol Med, 2017. **108**: p. 19-31.
178. Kimura, A., et al., *Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(28): p. 9721-6.
179. Quintana, F.J., et al., *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, 2010. **107**(48): p. 20768-73.
180. Veldhoen, M., et al., *Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells*. J Exp Med, 2009. **206**(1): p. 43-9.
181. Shinde, R., et al., *Apoptotic cell-induced AhR activity is required for immunological tolerance and suppression of systemic lupus erythematosus in mice and humans*. Nature immunology, 2018. **19**(6): p. 571-582.
182. Bessede, A., et al., *Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defence pathway*. Nature, 2014. **511**(7508): p. 184-90.
183. Ohtake, F., et al., *Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase*. Nature, 2007. **446**(7135): p. 562-566.

184. Carambia, A. and F.A. Schuran, *The aryl hydrocarbon receptor in liver inflammation*. Semin Immunopathol, 2021. **43**(4): p. 563-575.
185. Poland, A. and J.C. Knutson, *2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity*. Annual review of pharmacology and toxicology, 1982. **22**(1): p. 517-554.
186. Cervantes-Barragan, L., et al., *Lactobacillus reuteri induces gut intraepithelial CD4(+)CD8alphaalpha(+) T cells*. Science, 2017. **357**(6353): p. 806-810.
187. Bjeldanes, L.F., et al., *Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo: comparisons with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(21): p. 9543-7.
188. Sonderby, I.E., F. Geu-Flores, and B.A. Halkier, *Biosynthesis of glucosinolates--gene discovery and beyond*. Trends Plant Sci, 2010. **15**(5): p. 283-90.
189. Hubbard, T.D., I.A. Murray, and G.H. Perdew, *Indole and Tryptophan Metabolism: Endogenous and Dietary Routes to Ah Receptor Activation*. Drug Metab Dispos, 2015. **43**(10): p. 1522-35.
190. Opitz, C.A., et al., *An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor*. Nature, 2011. **478**(7368): p. 197-203.
191. Mezrich, J.D., et al., *An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells*. The Journal of Immunology, 2010. **185**(6): p. 3190-3198.
192. Rannug, A., et al., *Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances*. J Biol Chem, 1987. **262**(32): p. 15422-7.
193. Song, J., et al., *A ligand for the aryl hydrocarbon receptor isolated from lung*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(23): p. 14694-9.
194. Zhang, L.H., et al., *The aryl hydrocarbon receptor is required for the maintenance of liver-resident natural killer cells*. Journal of Experimental Medicine, 2016. **213**(11): p. 2249-2257.
195. Wincent, E., et al., *The suggested physiologic aryl hydrocarbon receptor activator and cytochrome P4501 substrate 6-formylindolo[3,2-b]carbazole is present in humans*. J Biol Chem, 2009. **284**(5): p. 2690-2696.
196. Smirnova, A., et al., *Evidence for New Light-Independent Pathways for Generation of the Endogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Agonist FICZ*. Chem Res Toxicol, 2016. **29**(1): p. 75-86.
197. Lee, J.S., et al., *AHR drives the development of gut ILC22 cells and postnatal lymphoid tissues via pathways dependent on and independent of Notch*. Nat Immunol, 2011. **13**(2): p. 144-51.

198. Qiu, J., et al., *The aryl hydrocarbon receptor regulates gut immunity through modulation of innate lymphoid cells*. *Immunity*, 2012. **36**(1): p. 92-104.
199. Shin, J.H., et al., *Modulation of natural killer cell antitumor activity by the aryl hydrocarbon receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(30): p. 12391-6.
200. Vogel, C.F., et al., *Aryl hydrocarbon receptor signaling mediates expression of indoleamine 2,3-dioxygenase*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **375**(3): p. 331-5.
201. Nguyen, N.T., et al., *Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(46): p. 19961-6.
202. Kimura, A., et al., *Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses*. *J Exp Med*, 2009. **206**(9): p. 2027-35.
203. Lahvis, G.P. and C.A. Bradfield, *Ahr null alleles: distinctive or different?* *Biochem Pharmacol*, 1998. **56**(7): p. 781-7.
204. Fernandez-Salguero, P., et al., *Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor*. *Science*, 1995. **268**(5211): p. 722-6.
205. Fernandez-Salguero, P.M., et al., *Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice*. *Vet Pathol*, 1997. **34**(6): p. 605-14.
206. Pierre, S., et al., *Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of liver fibrosis by dioxin*. *Toxicol Sci*, 2014. **137**(1): p. 114-24.
207. Yan, J., et al., *Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling Prevents Activation of Hepatic Stellate Cells and Liver Fibrogenesis in Mice*. *Gastroenterology*, 2019. **157**(3): p. 793-806 e14.
208. Zhang, Z., et al., *3,3'-Diindolylmethane ameliorates experimental hepatic fibrosis via inhibiting miR-21 expression*. *Br J Pharmacol*, 2013. **170**(3): p. 649-60.
209. Fabre, T., et al., *Type 3 cytokines IL-17A and IL-22 drive TGF-beta-dependent liver fibrosis*. *Sci Immunol*, 2018. **3**(28).
210. Hoshi, M., et al., *Kynurenine produced by indoleamine 2,3-dioxygenase 2 exacerbates acute liver injury by carbon tetrachloride in mice*. *Toxicology*, 2020. **438**: p. 152458.
211. Stone, T.W., N. Stoy, and L.G. Darlington, *An expanding range of targets for kynurenine metabolites of tryptophan*. *Trends Pharmacol Sci*, 2013. **34**(2): p. 136-43.
212. Kumar, S., et al., *Hepatic stellate cells increase the immunosuppressive function of natural Foxp3+ regulatory T cells via IDO-induced AhR activation*. *J Leukoc Biol*, 2017. **101**(2): p. 429-438.

213. Abe, H., et al., *Aryl hydrocarbon receptor plays protective roles in ConA-induced hepatic injury by both suppressing IFN-gamma expression and inducing IL-22*. *Int Immunol*, 2014. **26**(3): p. 129-37.
214. Alam, M.S., et al., *Notch signaling drives IL-22 secretion in CD4+ T cells by stimulating the aryl hydrocarbon receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(13): p. 5943-8.
215. Xu, M., et al., *Regulation of the development of acute hepatitis by IL-23 through IL-22 and IL-17 production*. *Eur J Immunol*, 2011. **41**(10): p. 2828-39.
216. Lu, Z., et al., *MicroRNA 15a/16-1 suppresses aryl hydrocarbon receptor-dependent interleukin-22 secretion in CD4(+) T cells and contributes to immune-mediated organ injury*. *Hepatology*, 2018. **67**(3): p. 1027-1040.
217. Neamah, W.H., et al., *AhR Activation Leads to Massive Mobilization of Myeloid-Derived Suppressor Cells with Immunosuppressive Activity through Regulation of CXCR2 and MicroRNA miR-150-5p and miR-543-3p That Target Anti-Inflammatory Genes*. *J Immunol*, 2019. **203**(7): p. 1830-1844.
218. Vuerich, M., et al., *Altered aryl-hydrocarbon-receptor signalling affects regulatory and effector cell immunity in autoimmune hepatitis*. *J Hepatol*, 2021. **74**(1): p. 48-57.
219. Grant, C.R., et al., *Dysfunctional CD39(POS) regulatory T cells and aberrant control of T-helper type 17 cells in autoimmune hepatitis*. *Hepatology*, 2014. **59**(3): p. 1007-15.
220. She, C., et al., *Effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin on T Cell Differentiation in Primary Biliary Cholangitis*. *Biomed Res Int*, 2020. **2020**: p. 1754975.
221. Ambrosio, L.F., et al., *Role of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) in the Regulation of Immunity and Immunopathology During Trypanosoma cruzi Infection*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 631.
222. Patel, R.D., et al., *Ah receptor represses acute-phase response gene expression without binding to its cognate response element*. *Lab Invest*, 2009. **89**(6): p. 695-707.
223. Krishnan, S., et al., *Gut Microbiota-Derived Tryptophan Metabolites Modulate Inflammatory Response in Hepatocytes and Macrophages*. *Cell Rep*, 2018. **23**(4): p. 1099-1111.
224. Wrzosek, L., et al., *Microbiota tryptophan metabolism induces aryl hydrocarbon receptor activation and improves alcohol-induced liver injury*. *Gut*, 2021. **70**(7): p. 1299-1308.
225. Choi, Y., M.A. Abdelmegeed, and B.J. Song, *Preventive effects of indole-3-carbinol against alcohol-induced liver injury in mice via antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic mechanisms: Role of gut-liver-adipose tissue axis*. *J Nutr Biochem*, 2018. **55**: p. 12-25.

226. Qian, M., et al., *Aryl Hydrocarbon Receptor Deficiency in Intestinal Epithelial Cells Aggravates Alcohol-Related Liver Disease*. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2022. **13**(1): p. 233-256.
227. Quintana, F.J., *Nanoparticles for the induction of antigen-specific Tregs*. *Immunotherapy*, 2013. **5**(5): p. 437-40.
228. Safe, S., S.O. Lee, and U.H. Jin, *Role of the aryl hydrocarbon receptor in carcinogenesis and potential as a drug target*. *Toxicol Sci*, 2013. **135**(1): p. 1-16.
229. Cheong, J.E. and L. Sun, *Targeting the IDO1/TDO2-KYN-AhR Pathway for Cancer Immunotherapy - Challenges and Opportunities*. *Trends Pharmacol Sci*, 2018. **39**(3): p. 307-325.
230. Care, I.o.L.A.R.C.o. and U.o.L. Animals, *Guide for the care and use of laboratory animals*. 1986: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National ...
231. Mohar, I., et al., *Acetaminophen-induced liver damage in mice is associated with gender-specific adduction of peroxiredoxin-6*. *Redox biology*, 2014. **2**: p. 377-387.
232. Sheng, Y., et al., *Acetaminophen induced gender-dependent liver injury and the involvement of GCL and GPx*. *Drug Discov Ther*, 2013. **7**(2): p. 78-83.
233. Reagan-Shaw, S., M. Nihal, and N. Ahmad, *Dose translation from animal to human studies revisited*. *Faseb j*, 2008. **22**(3): p. 659-61.
234. Yeste, A., et al., *Nanoparticle-mediated codelivery of myelin antigen and a tolerogenic small molecule suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(28): p. 11270-5.
235. Goettel, J.A., et al., *AHR activation is protective against colitis driven by T cells in humanized mice*. *Cell reports*, 2016. **17**(5): p. 1318-1329.
236. Di Meglio, P., et al., *Activation of the aryl hydrocarbon receptor dampens the severity of inflammatory skin conditions*. *Immunity*, 2014. **40**(6): p. 989-1001.
237. Hammerschmidt-Kamper, C., et al., *Indole-3-carbinol, a plant nutrient and AhR-Ligand precursor, supports oral tolerance against OVA and improves peanut allergy symptoms in mice*. *PLoS One*, 2017. **12**(6): p. e0180321.
238. Nebert, D.W., et al., *Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(23): p. 23847-50.
239. Puga, A., C. Ma, and J.L. Marlowe, *The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways*. *Biochemical pharmacology*, 2009. **77**(4): p. 713-722.
240. Iida, K., et al., *Suppression of AhR signaling pathway is associated with the down-regulation of UDP-glucuronosyltransferases during BBN-induced urinary bladder carcinogenesis in mice*. *Journal of biochemistry*, 2010. **147**(3): p. 353-360.

241. Erichsen, T.J., et al., *Genetic variability of aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated regulation of the human UDP glucuronosyltransferase (UGT) 1A4 gene*. Toxicology and applied pharmacology, 2008. **230**(2): p. 252-260.
242. Kalthoff, S., et al., *Coffee induces expression of glucuronosyltransferases by the aryl hydrocarbon receptor and Nrf2 in liver and stomach*. Gastroenterology, 2010. **139**(5): p. 1699-1710. e2.
243. Verreault, M., et al., *Regulation of endobiotics glucuronidation by ligand-activated transcription factors: physiological function and therapeutic potential*. Drug metabolism reviews, 2010. **42**(1): p. 110-122.
244. Xu, L., et al., *Dysregulation of UDP-glucuronosyltransferases in CCl4 induced liver injury rats*. Chemico-biological interactions, 2020. **325**: p. 109115.
245. Papageorgiou, I., M. Freytsis, and M.H. Court, *Transcriptome association analysis identifies miR-375 as a major determinant of variable acetaminophen glucuronidation by human liver*. Biochemical pharmacology, 2016. **117**: p. 78-87.
246. Alnouti, Y. and C.D. Klaassen, *Regulation of sulfotransferase enzymes by prototypical microsomal enzyme inducers in mice*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2008. **324**(2): p. 612-621.
247. Rushmore, T.H. and C. Pickett, *Transcriptional regulation of the rat glutathione S-transferase Ya subunit gene. Characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants*. Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(24): p. 14648-14653.
248. Schrenk, D., *Impact of dioxin-type induction of drug-metabolizing enzymes on the metabolism of endo-and xenobiotics*. Biochemical pharmacology, 1998. **55**(8): p. 1155-1162.
249. Ma, Q., *Induction of CYP1A1. The AhR/DRE paradigm transcription, receptor regulation, and expanding biological roles*. Current drug metabolism, 2001. **2**(2): p. 149-164.
250. Hu, W., et al., *Induction of cyp1a1 is a nonspecific biomarker of aryl hydrocarbon receptor activation: results of large scale screening of pharmaceuticals and toxicants in vivo and in vitro*. Molecular pharmacology, 2007. **71**(6): p. 1475-1486.
251. O'Donnell, E.F., et al., *The aryl hydrocarbon receptor mediates raloxifene-induced apoptosis in estrogen receptor-negative hepatoma and breast cancer cells*. Cell Death Dis, 2014. **5**: p. e1038.
252. O'donnell, E., et al., *The aryl hydrocarbon receptor mediates raloxifene-induced apoptosis in estrogen receptor-negative hepatoma and breast cancer cells*. Cell death & disease, 2014. **5**(1): p. e1038-e1038.
253. Ehrlich, A.K. and N.I. Kerkvliet, *Is chronic AhR activation by rapidly metabolized ligands safe for the treatment of immune-mediated diseases?* Current opinion in toxicology, 2017. **2**: p. 72-78.

254. Yanagiba, Y., et al., *Styrene trimer may increase thyroid hormone levels via down-regulation of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) target gene UDP-glucuronosyltransferase*. Environmental health perspectives, 2008. **116**(6): p. 740-745.
255. Ramachandran, A. and H. Jaeschke. *Acetaminophen hepatotoxicity*. in *Seminars in liver disease*. 2019. Thieme Medical Publishers.
256. Schilling, A., et al., *Acetaminophen: old drug, new warnings*. Cleveland Clinic journal of medicine, 2010. **77**(1): p. 19-27.
257. Schuran, F.A., et al., *Aryl hydrocarbon receptor activity in hepatocytes sensitizes to hyperacute acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice*. Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology, 2021. **11**(2): p. 371-388.
258. Lamas, B., et al., *CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands*. Nat Med, 2016. **22**(6): p. 598-605.
259. Natividad, J.M., et al., *Impaired Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand Production by the Gut Microbiota Is a Key Factor in Metabolic Syndrome*. Cell Metab, 2018. **28**(5): p. 737-749 e4.
260. Miani, M., et al., *Gut Microbiota-Stimulated Innate Lymphoid Cells Support beta-Defensin 14 Expression in Pancreatic Endocrine Cells, Preventing Autoimmune Diabetes*. Cell Metab, 2018. **28**(4): p. 557-572 e6.
261. Kaye, J., et al., *Laquinimod arrests experimental autoimmune encephalomyelitis by activating the aryl hydrocarbon receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(41): p. E6145-E6152.
262. Smith, S.H., et al., *Tapinarof is a natural AhR agonist that resolves skin inflammation in mice and humans*. Journal of Investigative Dermatology, 2017. **137**(10): p. 2110-2119.
263. Gold, L.S., et al., *A phase 2b, randomized clinical trial of tapinarof cream for the treatment of plaque psoriasis: Secondary efficacy and patient-reported outcomes*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2021. **84**(3): p. 624-631.
264. Robbins, K., et al., *Phase 2, randomized dose-finding study of tapinarof (GSK2894512 cream) for the treatment of plaque psoriasis*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2019. **80**(3): p. 714-721.
265. Barroso, A., et al., *The aryl hydrocarbon receptor and the gut-brain axis*. Cell Mol Immunol, 2021. **18**(2): p. 259-268.
266. Kulkarni, J.A., P.R. Cullis, and R. van der Meel, *Lipid Nanoparticles Enabling Gene Therapies: From Concepts to Clinical Utility*. Nucleic Acid Ther, 2018. **28**(3): p. 146-157.
267. Roberts, T.C., R. Langer, and M.J.A. Wood, *Advances in oligonucleotide drug delivery*. Nat Rev Drug Discov, 2020. **19**(10): p. 673-694.

268. Bhandari, S., et al., *The Scavenger Function of Liver Sinusoidal Endothelial Cells in Health and Disease*. *Front Physiol*, 2021. **12**: p. 757469.
269. Flotte, T.R., *Liver targeting with rAAV7: balancing tropism with immune profiles*. *Gene Ther*, 2021. **28**(3-4): p. 115-116.
270. Clayton, T.A., et al., *Pharmaco-metabonomic phenotyping and personalized drug treatment*. *Nature*, 2006. **440**(7087): p. 1073-7.

Kongressbeiträge

Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL)

Mainz, 2020 – Posterbeiträge:

Aryl hydrocarbon receptor activity in hepatocytes sensitizes to hyperacute acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. **Fenja A. Schuran**, Christoph Lommetz, Andreas Steudter, Björn Wieschendorf, Dorothee Schwinge, Joerg Heeren, Ansgar W. Lohse, Christoph Schramm, Johannes Herkel, Antonella Carambia

Nanoparticle-mediated peptide delivery to liver sinusoidal endothelial cells protects from CD8 T cell-driven cholangitis. C Gottwick, A Carambia, R Digigow, M Şeleci, D Mungalpara, M Heine, **FA Schuran**, D Schwinge, S Stein, AW Lohse, C Schramm, J Heeren, J Herkel.

The International Liver Congress™ European Association for the Study of the Liver (EASL)

Digital, 2020 – Posterbeitrag und Young Investigator Bursary:

Aryl hydrocarbon receptor activity in hepatocytes sensitizes to hyperacute acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. **Fenja A. Schuran**, Christoph Lommetz, Andreas Steudter, Ahmed Ghallab, Björn Wieschendorf, Dorothee Schwinge, Sebastian Zuehlke, Joerg Reinders, Joerg Heeren, Ansgar W. Lohse, Christoph Schramm, Johannes Herkel, Antonella Carambia

Publikationen

- 1) Clemens Wülfing, **Fenja Amrei Schuran**, Julia Urban, Jasmin Oehlmann, & Hauke Simon Günther. Neural architecture in lymphoid organs: Hard-wired antigen presenting cells and neurite networks in antigen entrance areas: Neural architecture in lymphoid organs. *Immunity, Inflammation and Disease* 2018; 6(2): 354–370.
- 2) Fabian Glaser, Clara John, Bastian Enge, Benedikt Hoh, Soren Weidemann, Jan Dieckhoff, Stephanie Stein, Nathalie Becker, Christian Casar, **Fenja Amrei Schuran**, Björn Wieschendorf, Max Preti, Friederike Jessen, Andre Franke, Antonella Carambia, Ansgar W. Lohse, Harald Ittrich, Johannes Herkel, Joerg Heeren, Christoph Schramm, Dorothee Schwinge. Liver infiltrating T cells regulate bile acid metabolism in experimental cholangitis. *Journal of Hepatology* 2019; Oct;71(4):783-792.
- 3) **Fenja A. Schuran**, Christoph Lommetz, Andreas Steudter, Ahmed Ghallab, Björn Wieschendorf, Dorothee Schwinge, Sebastian Zuehlke, Joerg Reinders, Joerg Heeren, Ansgar W. Lohse, Christoph Schramm, Johannes Herkel, Antonella Carambia. Aryl hydrocarbon receptor activity in hepatocytes sensitizes to hyperacute acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 2021;11(2):371-388.
- 4) Antonella Carambia, Cornelia Gottwick, Dorothee Schwinge, Stephanie Stein, Reinaldo Digigow, Muharrem Şeleci, Disha Mungalpara, Markus Heine, **Fenja A. Schuran**, Ansgar W. Lohse, Christoph Schramm, Joerg Heeren, Johannes Herkel. Nanoparticle-mediated targeting of autoantigen peptide to cross-presenting liver sinusoidal endothelial cells protects from CD8 T cell-driven autoimmune cholangitis. *Immunology*. 2021 Apr;162(4):452-463.
- 5) Stephanie Stein, Lara Henze, Tobias Poch, Antonella Carambia, Till Krech, Max Preti, **Fenja Amrei Schuran**, Maria Reich, Romina Fiorotto, Mario Strazzabosco, Johannes Herkel, Verena Keitel, Dorothee Schwinge*, Christoph Schramm*. IL-17 enables cholangiocytes to restrict T cell-driven experimental cholangitis via PD-1/PD-L1 interaction. *J Hepatol*. 2021 Apr;74(4):919-930. (*geteilte Senior-Autorschaft)
- 6) Max Preti, Lena Schlott, David Lübbering, Daria Krzikalla, Anna-Lena Müller, **Fenja A. Schuran**, Tobias Poch, Miriam Schakat, Sören Weidemann, Ansgar W. Lohse, Christina Weiler-Normann, Marcial Sebode, Dorothee Schwinge, Christoph Schramm, Antonella Carambia *, Johannes Herkel * Failure of thymic deletion and instability of autoreactive Tregs drive autoimmunity in immune-privileged liver. *JCI Insight*. 2021 Mar 22;6(6):e141462. (*gleichwertiger Beitrag)
- 7) Antonella Carambia and **Fenja Amrei Schuran**. The aryl hydrocarbon receptor in liver inflammation. *Semin Immunopathol*. 2021 Aug;43(4):563-575.

Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Johannes Herkel und meiner Projektleiterin Dr. Antonella Carambia für die Vergabe des spannenden Themas danken sowie für die anregenden Ideen, konstruktiven Diskussionen, die exzellente Betreuung und das nette Arbeitsklima. Ich danke ihnen für die Förderung meiner Immunhistologischen-Leidenschaft und für das Ermöglichen meiner kleinen Neurofilament-Exkurse. Ihre Unterstützung, ihr Engagement und ihr herausragendes Wissen haben meine Dissertation erst ermöglicht und mir sehr geholfen mich als Wissenschaftlerin weiterzuentwickeln. Besonderer Dank gilt dabei Antonella Carambia. Sie hat mir in den letzten vier Jahren in jeder erdenklichen Situation, mit viel Geduld, Rat und Tat beiseite gestanden und mich immer ermutigt und motiviert. Danke für den stets sehr liebevollen, freundschaftlichen und empathischen Umgang, das entgegengebrachte Vertrauen, Verständnis und den Rückhalt!

Außerdem möchte ich Dr. Dorothee Schwinge und Prof. Dr. Christoph Schramm für das nette Miteinander, ihr Interesse und das Feedback während meiner Arbeit danken. Ich danke Dorothee Schwinge zudem für Ihre selbstverständliche, umgängliche Art und für die Ermöglichung der Zusammenarbeit an anderen Projekten sowie für ihren Beistand bei SFB-Kolloquien. Für den fachlichen und privaten Austausch, die Hilfsbereitschaft, die tolle Arbeitsatmosphäre, belustigende Kaffeepausen und Grillabende danke ich allen Doktoranden, technischen Assistenten und Wissenschaftlern aus OG. 3 im Gebäude O58, insbesondere Dr. Daria Krzikalla für das Korrigieren dieser Arbeit. Auch danke ich der Mensa-Gruppe für das tägliche Philosophieren und die kulinarischen Kritiken um 11:30 Uhr. Für die hervorragende technische Unterstützung und Labororganisation danke ich Angelika Schmidt, Sabrina Kreß, Martina Fahl und Marko Hilken. Für die wissenschaftliche Kooperation und gewinnbringende Zusammenarbeit möchte ich Ahmed Ghallab, Sebastian Zühlke und Joerg Reinders ganz herzlich danken.

Ich danke Prof. Dr. Esther Diekoff für ihre Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten und den Beisitzenden meiner Disputation.

Zu guter Letzt danke ich meinen Freunden und meiner Familie für ihre Unterstützung. Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Vater Axel, der mich gelehrt hat, dass Mensch sein kämpfen bedeutet und mich immer bedingungslos unterstützt und bestärkt hat. In

höchster Bewunderung danke ich ebenfalls meinem Großvater Günther, der mir die Mathematik und Biologie näherbrachte und mir als Universalgelehrter inspirierend gezeigt hat, dass man sich zu jedem Zeitpunkt weiterentwickeln kann. Mein herzlichster Dank gilt Jonathan, für seine Liebe, sein Wesen, seinen Humor, seine Kraft und seinen Rückhalt, selbst in den wohl schlimmsten Momenten meines Lebens.

Ich selbst hätte niemals gedacht, dass ich einmal diesen Weg beschreite und ohne euch hätte ich diesen auch nie beschreiten können. DANKE!

Eidesstattliche Erklärung

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

Hamburg,

Ort, Datum

Unterschrift