

ZAUM – Zentrum Allergie und Umwelt an der Klinik
und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie
der Technischen Universität München

Direktor: Univ.-Prof. Dr. C. Schmidt-Weber

Experimentelle Dermato-Immunologie

**Th22 Zellen in der Leber – funktionelle Interaktion mit Hepatozyten in einem
Alkohol-dominierten Mikromilieu**

Alexander Robert Böhner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der
Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. K. G. Eyerich

2. Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid

Die Dissertation wurde am 25.06.2015 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.06.2016
angenommen.

Meinen Eltern

*Jeder junge Mensch macht früher oder später die verblüffende Entdeckung,
dass auch Eltern gelegentlich Recht haben können.*

André Malraux (1901-1976)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	4
1. Einleitung	5
1.1 Das Immunsystem	5
1.1.1 Aufbau und Systematik des Immunsystems.....	5
1.1.2 T-Zellen	8
1.1.2.1 Überblick der verschiedenen T-Zellpopulationen.....	8
1.1.2.2 Aktivierung von T-Helferzellen	10
1.1.2.3 Differenzierung und Einteilung der T-Helferzellen	12
1.2 Die Leber als immunologisches Organ	20
1.2.1 Funktion und Aufbau der Leber	20
1.2.2 Hepatisches Immunsystem.....	21
1.2.3 Alkoholische Lebererkrankung	23
2. Ziel der Arbeit	26
3. Material und Methoden	27
3.1 Materialien	27
3.1.1 Probanden.....	27
3.1.2 Zelllinien	27
3.1.3 Substanzen.....	27
3.1.4 Verbrauchsmaterial	31
3.1.5 Geräte	31
3.1.6 Verwendete Medien	32
3.2 Methoden.....	33
3.2.1 Isolierung und Kultivierung von primären humanen Zellen.....	33

3.2.1.1	Generierung spezifischer T-Zellklone aus einer Leberprobe	33
3.2.1.2	Charakterisierung und Expansion der T-Zellklone	39
3.2.1.3	Isolierung von CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -Zellen.....	40
3.2.1.4	Kultivierung der humanen Leberkarzinomzelllinie HepG2.....	41
3.2.1.5	Kultivierung humaner, primärer Hepatozyten (NHEPS™)	41
3.2.2	Stimulations-Experimente	42
3.2.2.1	Stimulationsexperimente mit HepG2 Zellen.....	42
3.2.2.2	Stimulationsexperimente mit primären Hepatozyten	43
3.2.3	Auswerteverfahren	45
3.2.3.1	Durchflusszytometrie	46
3.2.3.1.1	Extrazelluläre Färbung	46
3.2.3.1.2	Intrazelluläre Färbung	47
3.2.3.1.3	PI Färbung	48
3.2.3.2	Bestimmung der Zellviabilität.....	48
3.2.3.3	Enzyme linked immunosorbent Assay (ELISA)	50
3.2.3.4	Isolierung von mRNA und Generierung von cDNA.....	51
3.2.3.5	Real-Time-PCR.....	52
3.3	Statistische Auswertung	54
4.	Ergebnisse	55
4.1	Generierung spezifischer T-Zellklone aus einer Leberprobe	55
4.1.1	Charakterisierung der etablierten Leber T-Zelllinie.....	55
4.1.2	Charakterisierung der T-Zellklone	57
4.1.2.1	Bestimmung des Klon-Zytokinprofils mittels ELISA	57
4.1.2.2	Bestimmung des Klon-Zytokinprofils mittels Durchflusszytometrie	60
4.2	Effekt von T-Zellen auf HepG2-Zellen.....	61

4.2.1	Bestimmung des IL-22-Rezeptors auf HepG2-Zellen	61
4.2.2	Effekt spezifischer T-Zell-Subtypen auf HepG2-Zellen.....	63
4.3	Einfluss des Lebermikromilieus auf CD4 ⁺ -Zellen	67
4.3.1	Zytotoxischer Effekt von Ethanol auf HepG2-Zellen.....	67
4.3.2	<i>In Vitro</i> Einfluss eines alkoholischen Lebermikromilieus auf CD4 ⁺ -Zellen	69
4.3.3	<i>In Vitro</i> Einfluss eines TLR3-aktivierten Lebermikromilieus auf CD4 ⁺ -Zellen.....	71
4.4	Funktionelle Interaktion von IL-22 und IFN- γ in der T-Zellvermittelten Zytotoxizität	72
4.4.1	Durchflusszytometrische Bestimmung der MHC-I-Expression auf stimulierten primären Hepatozyten	73
4.4.2	Einfluss von IL-22 auf die IFN-g-vermittelte Zytotoxizität.....	74
5.	Diskussion	76
5.1	Charakterisierung von hepatischen T-Helferzellen.....	76
5.2	Einfluss von T-Helferzellen in der Leber.....	80
5.3	Wechselwirkung von T-Zellen und Leberzellen in der ALD	82
5.3	Immunologische Rolle von IL-22 in der Leber.....	84
5.4	Hypothese zur Rolle von T _H -22 /IL-22 in der ALD.....	85
6.	Zusammenfassung	89
	Literaturverzeichnis	91
	Dank	101
	Lebenslauf	102

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent	ml	Milliliter
Abb.	Abbildung	MTP	Mikrotiterplatte
AH	Alkoholische Hepatitis	mRNA	„messenger Ribo-Nucleic-Acid“
ALD	Alkoholische Lebererkrankung(en)	NKC	„natural killer cell(s)“
APC	Antigenpräsentierende Zelle(n)	nm	Nanometer
BSA	Bovines Serum Albumin	NF-κB	„nuclear factor“ κB
bzw.	Beziehungsweise	PAMPS	„pathogen associated molecular patterns“
°C	Grad Celsius	PBMC	„peripheral blood mononuclear cell(s)“
CCL	C-Chemokin-Ligand	pDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
CCR	Chemokin-Rezeptor	Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
CD	„cluster of differentiation“	PHA	Phythämagglutinin (=Lectin)
CTLA-4	„cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4“	PI	Propidiumiodid
CXCL	CX-Chemokin-Ligand	PRR	„pattern recognition receptor“
CXCR	CX-Chemokin-Rezeptor	µg	Mikrogramm
DAMPS	Danger associated molecular patterns	µl	Mikroliter
DC	Dendritische Zelle(n)	rpm	Rounds per minute
DNA	Desoxy-Ribonuklein-Säure	RPMI	Roswell Park Memorial Institute
DMSO	Dimethylsulfoxid	sec	Sekunden
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline	STAT	„signal transducer and activator of transcription“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	TCR	T-Zell-Rezeptor
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor	T _H	T-Helferzelle
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“	TLR	„toll like receptor,“
evtl.	eventuell	TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
FACS	„fluorescence associated cell sorter“	T _{reg}	T regulatorische Zelle
FOXP3	„forkhead box“ P3	Vgl.	Vergleiche
g	Gravitation	z. B.	Zum Beispiel
h	Stunde(n)		
HLA	Humanes Leukozyten Antigen		
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül		
IFN	Interferon		
ICOS	„inducible T cell costimulator“		
Ig	Immunglobulin		
IL	Interleukin		
LPS	Lipopolysaccharid		
MACS	„magnetic antibody column separation“		
MHC	„major histocompatibility complex“		
Min	Minuten		

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

1.1.1 Aufbau und Systematik des Immunsystems

Historisch gesehen leitet sich der Begriff Immunität von dem lateinischen Wort *immunitas* ab, was übersetzt so viel wie „frei sein von“ oder „unberührt“ bedeutet. Im alten Rom verstand man unter diesem Begriff den Schutz vor Strafverfolgung, den alle römischen Senatoren während ihrer Amtszeit genossen [1]. Medizinisch gesehen versteht man unter Immunität den Schutz vor Krankheiten. Das komplexe Netzwerk aus Zellen, Organen und Molekülen, die für diesen Schutz sorgen, bildet das Immunsystem. Dessen physiologische Funktion ist es, den Körper gegen infektiöse Mikroorganismen (Viren, Bakterien, Pilze), Parasiten, Fremdstoffe und maligne Zellen zu verteidigen. Grundlegendes Charakteristikum des Immunsystems ist dabei die Fähigkeit, zwischen körperfremden und körpereigenen Strukturen zu differenzieren [2].

Eingeteilt werden kann das Immunsystem je nach Kinetik und Spezifität in das sog. unspezifische angeborene und das spezifische erworbene (adaptive) Immunsystem. Beide Elemente arbeiten synergistisch zusammen und bestehen jeweils aus einem zellulären und einem humoralen Anteil [3, 4].

Das angeborene Immunsystem, auch als native Immunität bezeichnet, stellt die erste Verteidigungslinie zum Schutz gegen Mikroben dar. Der Körper kann damit sehr schnell auf eine Infektion reagieren. Zu den zellulären Komponenten des unspezifischen Immunsystems zählen neben den phagozytischen Zellen, wie Monozyten und Granulozyten, die dendritischen Zellen (*DC*), sowie die natürlichen Killerzellen (*NKC*) [5]. Die humorale Komponente besteht aus dem Komplementsystem und Zytokinen bzw. Chemokinen.

Zytokine sind eine große heterogene Gruppe löslicher Proteine, die von vielen verschiedenen Zelltypen produziert und sezerniert werden. Sie regulieren als Botenstoffe alle Aspekte des angeborenen und des erworbenen Immunsystems. Die meisten Zytokine haben viele unterschiedliche biologische Effekte und beeinflussen Aktivierung, Proliferation und Differenzierung ihrer jeweiligen Zielzellen. So unterscheidet man Zytokine, welche eine Funktion

auf lymphoide Zellen haben (Interleukine), die Chemotaxis von Zellen induzieren (Chemokine), in der antiviralen Abwehr fungieren (Interferone) oder als Wachstumsfaktoren hematopoietischer Zellen agieren (Kolonie-stimulierende Faktoren). Weiterhin werden Zytokine nach ihrer Rolle bei der Immunantwort in entzündungsfördernde (proinflammatorische) und entzündungshemmende (antiinflammatorische) Zytokine unterschieden.

Ein weiterer wichtiger Bereich des angeborenen Immunsystems, der primär das Eindringen von Krankheitserregern in den Körper zu verhindern sucht, stellen die physikalischen (z. B. Epithelien) und chemischen (z. B. Magensäure) Barrieren dar [6].

Überwindet ein Pathogen diese Barrieren, erkennen die Zellen des angeborenen Immunsystems mit Hilfe sog. Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors, PRR*) unspezifische pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (*pathogen associated molecular patterns, PAMP*) auf der Erregeroberfläche [7, 8]. So erkennen beispielsweise Monozyten mit Hilfe des Toll-like Rezeptors 4 (TLR-4) das Lipopolysaccharid (LPS) in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien [9]. Die so erkannten Bakterien können daraufhin gezielt abgetötet werden. Neben diesem Abwehrmechanismus können die Zellen des unspezifischen Immunsystems durch Ausschüttung von proinflammatorischen Botenstoffen auch eine Entzündungsreaktion auslösen. So werden schließlich auch Zellen des adaptiven Immunsystems zum Infektionsort rekrutiert.

Das angeborene Immunsystem stellt eine effektive frühe Antwortmöglichkeit gegen Infektionen dar. Jedoch sind viele pathogene Mikroben im Laufe der Entwicklung gegen diese unspezifischen Mechanismen resistent geworden. Für ihre Elimination wird das leistungsfähigere erworbene Immunsystem benötigt. Dieses braucht jedoch bei Erstkontakt mit dem Erreger etwa eine Woche, um Antigen-spezifische Zellen zu generieren, und setzt im Vergleich zur nativen Immunität zeitlich verzögert ein.

Charakteristisches Merkmal der adaptiven Immunität ist ihre hohe Spezifität für bestimmte Moleküle und die Fähigkeit der Gedächtnisbildung. Der Name „spezifisches Immunsystem“ rührt von der Fähigkeit dieses Abwehrsystems, selbst zwischen eng verwandten Mikroben unterscheiden zu können [1]. Des Weiteren führt aufgrund des Immungedächtnisses eine erneute Infektion mit dem gleichen Erreger zu einer effektiveren und schnelleren Abwehrreaktion.

Die zelluläre Komponente der erworbenen Immunantwort besteht aus den beiden Zellpopulationen der B- und T-Lymphozyten. Diese sind aufgrund der klonalen Rekombination ihrer Antigenrezeptoren während der frühen Zelldifferenzierung hoch spezialisiert auf die Abwehr von Erregern. Bei diesem auch als somatische Rekombination bezeichneten Prozess wird die genetische Information zur Bildung der Antigenrezeptoren, welche auf mehrere Gensegmente verteilt ist, während der Zellreifung zufällig zusammengesetzt. Jeder Lymphozyt trägt daher auf seiner Zelloberfläche Antigenrezeptoren nur einer einzigen Spezifität. Bei B-Zellen entsprechen diese den Antikörpern und bei T-Zellen den T-Zell-Rezeptoren (TCR) [10]. Die humorale Komponente des adaptiven Immunsystems besteht aus von den B-Zellen bzw. Plasmazellen sezernierten Antikörpern sowie aus Zytokinen, wie auch bei der unspezifischen Immunität.

Dringt nun ein Pathogen in den Körper ein, wird dieses zuerst von sog. Antigen-präsentierenden Zellen (APC), bestehend aus dendritischen Zellen, B-Zellen und Makrophagen, in der Peripherie aufgenommen und lysosomal verdaut [11]. Die daraus entstehenden pathogen-spezifischen Peptide werden anschließend mit Hilfe von humanen Leukozyten-Antigen-Komplexen (HLA, *engl. major histocompatibility complex, MHC*) der Klasse-II auf der Oberfläche präsentiert und führen zu einer Aktivierung der entsprechenden T-Lymphozyten [12, 13]. Diese wiederum stimulieren B-Zellen zur Proliferation und Sezernierung von Antikörpern oder können auch durch Auslösung einer Entzündung andere Immunzellen aktivieren. Die durch Antikörper markierten Pathogene, man spricht bei diesem Prozess auch von Opsonierung, können nun von Phagozyten oder von NK-Zellen gezielt aufgenommen und zerstört werden.

Manche Erreger wie z. B. Viren können jedoch in die Körperzellen eindringen, was eine Opsonierung deutlich erschwert. Es braucht daher noch einen anderen Schutzmechanismus. Während die HLA-II-Komplexe in der Regel nur auf den zuvor genannten APC-Zellen zu finden sind, werden HLA-Klasse-I-Moleküle auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Auf diesen Komplexen können innerhalb der Zelle durch das Proteasom prozessierte Peptide auf der Zelloberfläche präsentiert werden [14]. Die Zelle ist damit in der Lage, ihre Infektion für Zellen des Immunsystems sichtbar zu machen. Bei Erregerfreiheit präsentieren die kernhaltigen Zellen körpereigene Peptide, sog. „Selbst-Peptide“, die T-Lymphozyten während ihrer Entwicklung im Thymus zu unterscheiden und tolerieren gelernt haben [15].

Je nachdem, welche Pathogen-Peptid-Präsentation erfolgt, werden unterschiedliche Zellen des spezifischen Immunsystems aktiviert. So werden T-Lymphozyten abhängig davon, an welches MHC-Molekül sie binden, in CD4⁺-T-Helferzellen (MHC-II) und CD8⁺-zytotoxische T-Zellen (MHC-I) unterschieden. Bei den CD-Antigenen (Cluster of Differentiation) handelt es sich um oberflächengebundene Moleküle, die teilweise zellspezifisch exprimiert werden und verschiedenste Funktionen haben können. So ist eine Antigenerkennung des TCR der auf MHC-I bzw. MHC-II präsentierten Antigene ohne Ko-Rezeptoren CD8 bzw. CD4 nicht möglich [16]. Neben der Antigenerkennung erfordert die Aktivierung von Abwehrmechanismen auch die Wechselwirkung mit den CD-Antigenen auf anderen spezialisierten Zellen sowie von Zytokinen.

Die Einteilung des Immunsystems in ein angeborenes und ein erworbenes System bedeutet nicht, dass diese vollkommen unabhängig voneinander arbeiten. Im Gegenteil, es besteht sogar eine enge Verflechtung dieser beiden Systeme [17]. So erfolgt beispielweise die Anlockung der T- und B-Zellen zum Ort der Infektion über freigesetzte Botenstoffe aus Zellen des unspezifischen Immunsystems. Des Weiteren erfolgt die Antigen-abhängige Aktivierung von T-Helferzellen durch direkten Zell-Zellkontakt mit APC, welche wiederum zur angeborenen Immunität gezählt werden.

1.1.2 T-Zellen

1.1.2.1 Überblick der verschiedenen T-Zellpopulationen

Lymphozyten sind die einzigen Zellen im Körper, die klonal verteilte Antigenrezeptoren exprimieren, welche jeweils spezifisch für ein bestimmtes Antigen sind. T-Lymphozyten wurden gemäß ihrer Entwicklungsphase im Thymus benannt. Das „T“ steht dabei für „vom Thymus stammende“ Lymphozyten.

Die zwei Hauptpopulationen der T-Zellen sind die CD4⁺-T-Helferzellen und die CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen. Der Terminus Helferzelle stammt von der Beobachtung, dass diese Zellen B-Zellen bei der Bildung von Antikörpern (humorale Immunität) unterstützen. Auf der anderen

1. Einleitung

Seite können T-Helferzellen z. B. über die Aktivierung von Makrophagen auch für die Zell-vermittelte Immunität verantwortlich sein. Neben den T-Helferzellen bilden die CD4⁺-regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) eine dritte Gruppe. Die CD4⁺-T-Zellpopulation reguliert die Immunantwort dabei durch Auslösung bzw. Inhibition (T_{reg}) von Proliferation, Differenzierung und Aktivierung anderer Immunzellen.

Diese drei T-Zellpopulationen exprimieren alle den $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor, auch TCR2 genannt. Dieses Heterodimer bestehend aus den beiden Proteinketten alpha und beta ist auf mehr als 95 % der T-Zellen im Blut vorhanden.

Eine kleine Gruppe von T-Zellen, die sog. $\gamma\delta$ T-Lymphozyten, welche nur 3-5 % der sich in Zirkulation befindenden T-Zellen ausmachen und in der Regel kein CD4 bzw. CD8 besitzen [18], exprimieren den $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor [19, 20]. Dieser auch als TCR1 bezeichnete Rezeptor besteht aus den Ketten gamma und delta. Im Vergleich zu TCR2, der nur auf MHC-Komplexe geladene Moleküle erkennen kann, registriert der TCR1 unkonventionelle, klein-peptidige Antigene wie z. B. die Stressmoleküle MICA und MICB unabhängig von HLA-Komplexen [21, 22]. *Tabelle 1* fasst die wichtigsten T-Zellpopulationen zusammen.

Tabelle 1: T-Zell-Subpopulationen

T-Zellpopulation:	Funktion:	TCR und Spezifität:	CD-Marker:
$\alpha\beta$ T-Lymphozyten:			
CD4 ⁺ T-Helferzellen	<ul style="list-style-type: none">- B-Zell Differenzierung (humorale Immunität)- Makrophagen-Aktivierung (zelluläre Immunität)- Stimulation der Entzündung	$\alpha\beta$ Heterodimer MHC-II spezifisch	CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁻
CD8 ⁺ zytotoxische T-Zellen	<ul style="list-style-type: none">- Abtötung von mit Viren oder intrazelluläre Bakterien infizierten Zellen- Tumorabwehr	$\alpha\beta$ Heterodimer MHC-I spezifisch	CD3 ⁺ , CD4 ⁻ , CD8 ⁺

1. Einleitung

Regulatorische T-Zellen	<ul style="list-style-type: none">- Supprimiert andere T-Zellen und reguliert dadurch die Immunantwort- Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz	$\alpha\beta$ Heterodimer unbekannt	CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD25 ⁺
$\gamma\delta$ T-Lymphozyten:	<ul style="list-style-type: none">- Helfer und zytotoxische Funktionen	$\gamma\delta$ Heterodimer MHC unabhängige Spezifität	CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ^(variabel)

Des Weiteren können T-Zellen je nach Aktivierung in naive und Effektor-Zellen eingeordnet werden. Naive T-Lymphozyten sind unreife Zellen, die nach Selektion im Thymus kontinuierlich durch die peripheren lymphatischen Organe, das Blut oder andere Gewebe zirkulieren [23] und noch keinen Kontakt mit einem Antigen hatten. Sie befinden sich in einer Art Ruhephase und erfüllen noch keine Funktion. Überlebenssignale erhalten sie durch die schwache Erkennung von körpereigenen Peptiden auf MHC-Komplexen sowie den Zytokinen IL-7 und IL-15 [24]. Gekennzeichnet sind naive T-Zellen durch das Oberflächenmolekül CD45RA. Das Antigen CD45 befindet sich auf der Zelloberfläche aller Leukozyten und wird im Englischen auch als „*leukocyte common antigen*“ bezeichnet [25]. Abhängig vom Zelltypus und dem Aktivierungsgrad wurden verschiedene Isotypen dieses Oberflächenmarkers identifiziert [26].

Nachdem naive T-Zellen durch ihr jeweiliges spezifisches Antigen aktiviert wurden, wandeln sie sich in Effektor-T-Lymphozyten um, welche nun CD45RO tragen. Diese Isoform von CD45 kann durch Zusammenlagerung mit dem TCR die Antigenerkennung auf molekularer Ebene erleichtern. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Einteilung in CD45RA⁺-naive T-Zellen und CD45RO⁺-Effektor/Gedächtnis T-Zellen nicht komplett zutreffend ist, da T-Zellen sich von CD45RO⁺ wieder in CD45RA⁺ zurück wandeln können [27].

1.1.2.2 Aktivierung von T-Helferzellen

Trifft eine naive CD4⁺-T-Helferzelle auf eine APC, deren auf MHC-II präsentierte Antigen vom TCR erkannt wird, kann diese Zelle aktiviert werden. Dieser Prozess ist jedoch nicht nur von der Wechselwirkung zwischen dem TCR und dem HLA-Peptid-Komplex abhängig, sondern benötigt ebenfalls die Interaktion von kostimulatorischen Molekülen beider Zellen [13]. Fehlen diese Signale und erhält die T-Zelle somit nur das Signal über den TCR, wird sie anergisch oder sogar apoptotisch [28]. Unter Anergie versteht man die fehlende Reaktion auf ein Antigen unter Abschaltung der Immunantwort. Das Immunsystem kann so verhindern, dass T-Zellen körpereigene Strukturen angreifen.

Lafferty et al. beschrieben erstmals dieses sog. „Zwei Signal Modell“ (*engl. two signal concept*), demzufolge es zur Aktivierung von T-Zellen immer zwei Signale benötigt [29]. Zentraler Bestandteil des ersten Aktivierungssignals ist der TCR-Komplex. Dieser besteht aus dem TCR-Heterodimer sowie dem nicht kovalent assoziierten CD3-Komplex. CD3 besteht aus fünf Untereinheiten und ist auf allen T-Zellen exprimiert. Es spielt eine essentielle Rolle bei der Übermittlung des Signals ins Zellinnere, das durch die Bindung des TCR an den MHC-II-Peptid-Komplex ausgelöst wird [30].

Für das zweite Signal wurde eine große Reihe verschiedener kostimulatorischer Moleküle beschrieben. Der als erster vorgestellte und auch am besten charakterisierte ist der B7-1/B7-2: CD28 Stimulationsweg (*vgl. Abb. 1*). Nach Aktivierung der T-Zelle über den TCR-Komplex (1. Signal) kommt es zur Expression von CD154, auch als CD40-Ligand (CD40L) bezeichnet, auf den teilaktivierten T-Zellen. Dieser bindet an das konstitutiv von APC präsentierte CD40, woraufhin es zur Expression von CD80 bzw. CD86 (B7-1/B7-2) auf der APC kommt. Mit diesem kann anschließend das T-lymphozytäre Molekül CD28 interagieren, was zu einer starken kostimulatorischen Aktivierung (2. Signal) der T-Zelle führt [31].

Ursprünglich wurde auch angenommen, dass das CD28 Homolog, CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4*), ebenfalls dieses zweite Aktivierungssignal übermitteln kann, da es eine noch höhere Affinität zu B7-1/B7-2 besitzt [32]. Jedoch zeigte sich, dass durch CTLA-4 ein inhibitorisch sekundäres Signale übermittelt wird [33].

Ein weiteres System zur Übermittlung des kostimulatorischen Signals stellt der *inducible T cell costimulator* (ICOS) dar. Bei diesem handelt es sich auch um ein CD28 Homolog, welches mit dem ICOS-Liganden (ICOS-L), einem B7 Homolog, interagiert und ebenfalls die T-

1. Einleitung

Zellaktivierung steigert [34]. Jedoch scheint ICOS noch andere Funktionen zu haben, wie z. B. Modulierung der IL-10 Funktion und Einflussnahme auf die Zelldifferenzierung [35].

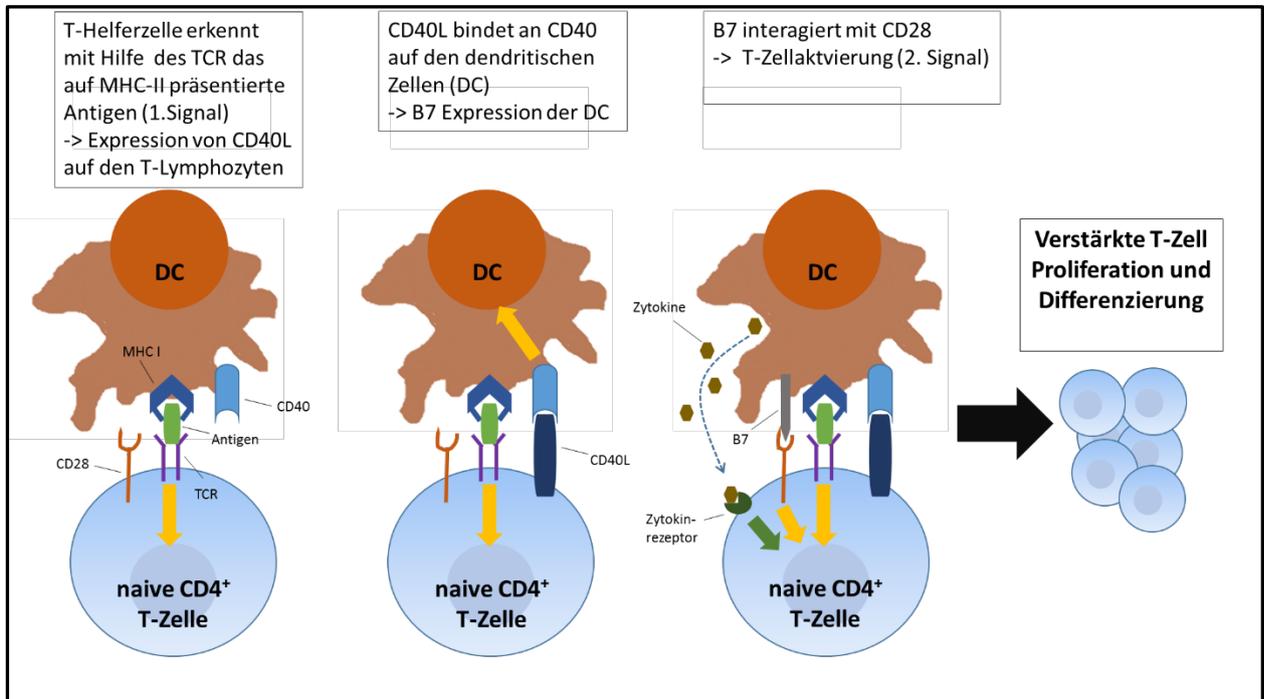


Abbildung 1: T-Helferzell-Aktivierung über B7-1/B7-2 : CD28 Stimulationsweg

Naive T-Zellen werden durch Bindung des TCR an den Antigen-MHC-II-Komplex teilaktiviert (1.Signal), was die Expression des CD40-Liganden zur Folge hat. Dieser interagiert mit dem CD40 auf den APC und stimuliert dadurch die Expression des B7-Moleküls sowie die Sekretion von T-Zell-aktivierende und für deren Differenzierung wichtige Zytokine. Das B7-Molekül interagiert schließlich mit CD28 und übermittelt das 2. Signal zur T-Zellaktivierung.

Erhält die T-Zelle beide Signale, führt dies zu ihrer Aktivierung, welche mehrere Reaktionen nach sich zieht. Zum einen proliferiert die aktivierte T-Zelle in mehrere antigen-spezifische Klone, man spricht auch von klonaler Expansion. Dabei wird sie unter anderem durch die autokrine Produktion von IL-2 unterstützt. Zum anderen differenzieren sich die naiven Zellen in Effektor- bzw. Gedächtnis-Lymphozyten.

Die aktivierte Effektor-T-Helferzelle migriert daraufhin entweder in periphere Gewebe oder interagiert mit anderen Zellen innerhalb des lymphatischen Gewebes.

1.1.2.3 Differenzierung und Einteilung der T-Helferzellen

Nach Aktivierung können die naiven $CD4^+$ -T-Zellen in verschiedene Kategorien von T-Helferzellen differenzieren, die eine entscheidende Rolle in der Steuerung der adaptiven Immunantwort spielen [36]. Die Bedingungen, unter denen die aktivierte T-Helferzelle stimuliert wird, haben großen Einfluss auf den funktionalen Phänotyp der aktivierten Zelle.

Entscheidend für die Differenzierung von $CD4^+$ -Zellen in die jeweiligen Subklassen, auch Polarisierung genannt, sind die von APC und auch von anderen Immunzellen produzierten Zytokine am Ort der Entzündung [37-39]. Dieses für eine Entzündung jeweils spezifische Zytokinmilieu ist einer der wichtigsten Differenzierungsfaktoren von naiven T-Zellen und stellt sicher, dass genau die Effektorzellen gebildet werden, die schließlich im Gewebe zur Eliminierung des eingedrungenen Pathogens notwendig sind. Dieser Zytokincocktail wird auch als das 3. Signal in der Differenzierung naiver T-Zellen hin zu Effektorzellen bezeichnet.

Weitere wichtige auf die Differenzierung einflussnehmende Faktoren sind unter anderem der Eintrittsweg des Antigens in den Körper (z. B. Haut, Lunge usw.), die Antigenstruktur und die Antigenmenge [40]. Auf zellulärer Ebene wird die T-Zelldifferenzierung über das Ausmaß der TCR-Aktivierung [41] und die Aktivitäten der verschiedenen kostimulatorischen Signalwege beeinflusst [42, 43].

Die definierenden Kriterien zur Einordnung der Effektor-T-Zellen in bestimmte Subtypen sind die von ihnen produzierten Zytokine, die exprimierten Transkriptionsfaktoren, bestimmte Oberflächenmoleküle sowie epigenetische Veränderungen in den Zytokin-Genen [44].

Wo naive $CD4^+$ -Zellen während der Aktivierung hauptsächlich IL-2 produzieren, sind Effektor-T-Zellen in der Lage, eine Vielzahl verschiedener Zytokine zu produzieren. Die für den jeweiligen T-Zell-Subtyp charakteristischen Zytokine bestimmen ihre Funktion und Rolle in Erkrankungen. Des Weiteren spielen sie auch eine Rolle in der Entwicklung und Expansion des jeweiligen Subtyps. So verstärken die jeweiligen T-Helferzell-Subtyp-spezifischen Zytokine eine Entwicklung der aktivierten T-Zelle in exakt diesen Subtyp und verhindern die Differenzierung in eine andere $CD4^+$ -Subpopulation. Sie fungieren somit als eine Art autokriner Wachstums- und Differenzierungsfaktor. Eine kontinuierliche Stimulierung mit bestimmten Zytokinen führt zu

einer epigenetischen Veränderung der für den jeweiligen Subtyp speziellen Zytokin-Gene. Dadurch werden diese Gene dauerhaft leichter für die Transkription zugänglich [38, 39].

Abbildung 2 gibt einen Überblick der Differenzierung von naiven CD4⁺-T-Zellen in die verschiedenen Subpopulationen.

T_H-1- / T_H-2-Zellen:

Bereits in den 1980er Jahren demonstrierten Mosmann et al., dass CD4⁺-T-Zellklone aufgrund des Musters ihrer Zytokinproduktion in zwei verschiedene Populationen unterteilt werden können, die aufgrund ihrer zeitlichen Entdeckung als T_H-1 und T_H-2 bezeichnet wurden [45].

Das Schlüsselzytokin der T_H-1-Zelle ist das IFN- γ . Daneben ist dieser Typ auch durch die Produktion von Lymphotoxin (TNF- β) sowie TNF- α charakterisiert. T_H-1-Zellen werden zudem mit der Expression der Rezeptoren CXCR3 und CCR5 assoziiert [46].

Die von diesem Zelltyp ausgelöste Immunantwort, auch Typ-1-Antwort genannt, führt zur Aktivierung von Phagozyten und zur Produktion von opsonierenden und Komplement-bindenden Antikörpern. Sie spielt daher eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von intrazellulären Bakterien [47], Protozoen [48] und Viren [49]. Weiterhin wurde gezeigt, dass T_H-1-Zellen auch in der Antitumor-Immunität eine wichtige Funktion ausüben [50].

Für die Differenzierung in Typ-1-Zellen wichtige Zytokine sind besonders IL-12 und IFN- γ [51, 52]. Diese Botenstoffe binden an die Membranrezeptoren naiver T-Zellen, welche das Signal nach intrazellulär über Transkriptionsfaktoren weiterleiten. So löst die Bindung des IL-12 an seinen Rezeptor die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT4 (*engl. signal transducer and activator of transcription*) aus, welcher die Expression zahlreicher T_H-1-Gene wie z. B. IFN- γ fördert [53-55]. In dieser Funktion arbeitet STAT4 mit dem Transkriptionsfaktor T-bet zusammen, der durch das TCR-Signal induziert wird und mit der Aktivierung von STAT1 verstärkt exprimiert wird. STAT1 wiederum wird durch auto- bzw. parakrin-produziertes IFN- γ aktiviert [52, 56, 57]. T-bet führt seinerseits über die Hochregulation des IL-12-Rezeptors und einer Umgestaltung des IFN- γ -Gens zu einer vermehrten Expression von IFN- γ [58].

Gleichzeitig bewirkt T-bet mit dem von ihm induzierten Runx3 durch Bindung an einen Silencer des IL-4-Gens eine Unterdrückung dieses T_H-2-Gens [59, 60]. Eine entscheidende Rolle in der

Polarisation von T_H-1 und T_H-2 spielt daher die antagonisierende Wirkung von T-bet auf den T_H-2-charakteristischen Transkriptionsfaktor GATA-3 [61].

Die Schlüsselzytokine der T_H-2-Zelle sind IL-4, IL-5 und IL-13. Ihre Immunantwort (Typ 2) richtet sich vor allem gegen parasitäre Helminthen [62] und ist auch in der Pathogenese von atopischen Krankheiten involviert. Im Gegensatz zur T_H-1-Antwort wird die T_H-2-Immunität oft mit einer humoralen Antwort assoziiert, in der hohe Level von pathogen spezifischen Antikörpern zur Neutralisation von extrazellulären Organismen gemessen werden.

So führen IL-4 und IL-13 zur Produktion von Antikörpern der Klasse IgE in B-Zellen [63]. IL-5 hingegen aktiviert eosinophile Granulozyten [64]. Daneben sind T_H-2-Zellen zudem mit der Expression der Rezeptoren CCR3, CCR4 sowie des Prostaglandin D₂-Rezeptors (CRTh2) assoziiert [46].

Das für die Differenzierung in Typ-2-Zellen entscheidende Zytokin ist IL-4 [65]. Die Interaktion des endogenen und/oder exogenen IL-4 mit seinem Rezeptor auf naiven T-Zellen aktiviert den Transkriptionsfaktor STAT6, welcher seinerseits die Expression von GATA-3 induziert [66]. GATA-3 führt zur Umstrukturierung des Chromatins am sog. T_H-2-Lokus, was die Transkription der IL-4-, IL-5- und IL-13-Gene erleichtert [38]. Darüber hinaus verhindert es, durch Inhibierung der IL-12-Rezeptor- und STAT4-Expression, die T_H-1-Differenzierung [67, 68].

Zelltypen, die sowohl ein T_H-1- als auch ein T_H-2-Zytokinmuster aufweisen, werden als T_H-0-Zellen bezeichnet [69].

Abgesehen von der Zytokin-abhängigen Differenzierung in T_H-1- bzw. T_H-2-Zellen gibt es noch den sog. Notch-Signalweg. Mit diesem kann Zytokinproduktion unabhängig über die kostimulatorischen Notch Liganden der APC eine Typ-1- bzw. Typ-2-Polarisierung ausgelöst werden [70].

Neben ihren funktionalen Unterschieden in der Bekämpfung von Pathogenen sind die beiden Zelltypen auch an der Entwicklung von bestimmten humanen Erkrankungen beteiligt. T_H-1-Zellen wird eine tragende Rolle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen zugeschrieben,

wohingegen T_H -2-Zellen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von allergischen Krankheiten spielen [71, 72].

T_H -17-Zellen:

Vor wenigen Jahren wurde eine dritte T-Helferzellpopulation entdeckt, die wegen ihres Schlüsselzytokins, IL-17, als T_H -17 bezeichnet wird. Bereits im Jahr 1995 wurden schon IL-17-produzierende $CD4^+$ -T-Zellen beschrieben [73], die jedoch erst 2005 als eigenständige Zellpopulation charakterisiert wurden [74, 75].

Diese Zellen sind charakterisiert durch die Produktion der Zytokine IL-17A, IL-17F, und IL-22 [76]. Zusätzlich zu diesen Botenstoffen werden auch IL-21 und CCL20 produziert [77]. Des Weiteren wird dieser T-Helferzellen-Subtyp mit dem Mukosa-assoziierten Chemokinrezeptor CCR6 in Verbindung gebracht [78].

T_H -17-Zellen beeinflussen eine große Bandbreite an verschiedenen Zellen und nehmen neben der Infekt-abwehrenden Funktion von extrazellulären Bakterien und Pilzen [76, 79, 80] auch eine wichtige Stellung bei inflammatorischen und autoimmunologischen Erkrankungen ein.

Während einer Infektion können T_H -17-Zellen durch Rekrutierung anderer Immunzellen zum Ort der Entzündung, den Körper vor eingedrungenen Pathogenen schützen. Von besonderer Bedeutung ist bei diesem Prozess die Sezernierung des proinflammatorischen Zytokins IL-17, welches durch die Induktion der Chemokine CXCL8 (IL-8), CXCL1/3/5/6 und IL-6 neutrophile Granulozyten anlocken kann [81, 82]. Daneben bewirkt IL17 auch die Expression von antimikrobiellen Peptiden [82] in Epithelzellen.

Die ausgeprägte Fähigkeit der T_H -17-Zellen, Gewebsinflammation und Autoimmunität auszulösen, liegt vor allem an der ubiquitären Verteilung des IL-17- und IL-22-Rezeptors in diversen Geweben [83]. Besonders in autoimmunologischen Erkrankungen wie beispielsweise der rheumatoiden Arthritis oder bei Multiple Sklerose, die vor der T_H -17-Entdeckung ursprünglich T_H -1-Zellen zugerechnet wurden, scheint diese T-Helferzell-Subklasse eine wichtige Komponente einzunehmen [84-86].

Für die Differenzierung zu T_H -17-Zellen nehmen die Botenstoffe TGF- β , IL-6 und IL-21 eine wichtige Rolle ein [83]. Während TGF- β alleine naive T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen (T_{regs}) differenziert, bewirkt die zusätzliche Präsenz von IL-6 plus IL-21 oder IL-21 eine Differenzierung

zu T_H-17-Zellen [87-89]. Da IL-21 auch von T_H-17-Zellen produziert wird, hat es die Funktion einer positiven Rückkopplung und ist in der Lage, die Frequenz an T_H-17-Zellen zu amplifizieren [90]. TGF- β führt zwar zu einer Hochregulation von ROR γ t (*retinoic acid-related orphan receptor*), ein für T_H-17-Zellen spezifischer Transkriptionsfaktor, jedoch wird dessen Funktion vermutlich ebenfalls durch TGF- β inhibiert. Nur in Kostimulation mit IL-6 bzw. IL-21 wird ROR γ t enthemmt und kann mit der Transkription von IL-17 beginnen [89]. IL-23 und IL-1 sind zwar keine direkten Differenzierungsfaktoren von T_H-17-Zellen, jedoch können sie die Differenzierung stabilisieren und zu einer weiteren Reifung der Zelle beitragen [83].

Im Gegensatz dazu supprimieren IFN- γ und IL-4 die T_H-17-Entwicklung. Eine starke T_H-1- bzw. T_H-2-Immunantwort unterdrückt daher die T_H-17-Bildung [91].

T_H-22-Zellen:

Im Jahr 2009 wurde eine vierte, zuerst in der Haut beschriebene, T-Zellsubpopulation entdeckt, die gemäß ihrem Schlüsselzytokin IL-22 als T_H-22 bezeichnet wird [92].

Diese Zellen werden charakterisiert durch die Produktion von IL-22, IL-13 und TNF- α . Wie T_H-17-Zellen exprimieren auch T_H-22-Zellen IL-22, CCR4 und CCR6, jedoch zusätzlich CCR10 und verschiedene fibroblastische Wachstumsfaktoren (FGF). Nicht bei dieser Population zu finden hingegen sind IL-17 und CCL20 (T_H-17-Marker), IL-4 (T_H-2-Marker) und IFN- γ (T_H-1-Marker). Zusammengenommen charakterisieren diese Eigenschaften die T_H-22-Zelle als neuen T-Helferzellsubtyp [92-94]. T_H-22-Zellen, als eigene T-Helferzellpopulation, wurden bisher nur im Menschen nachgewiesen, in der Maus gelang dieser Nachweis noch nicht [95].

Die Expression von CCR4 und CCR10 legt nahe, dass diese Zellen eine wichtige Funktion in der Haut ausüben. So sezernieren Keratinozyten und kutane Venolen die Liganden von auf Th22-exprimiertem CCR10 (CCL17 bzw. CCL27). In der Tat zeigen verschiedene Studien, dass T_H-22-Zellen vor allem in entzündeten Geweben einiger Hauterkrankungen wie z. B. der Psoriasis angetroffen werden, wobei sie eine wichtige Rolle in der Pathogenese dieser Erkrankungen zu spielen scheinen [96].

Obwohl IL-22 ursprünglich T_H-1-Zellen zugerechnet worden ist [97], wurde es seit der Entdeckung der T_H-17-Population mit dieser Gruppe in Verbindung gebracht. Tatsächlich jedoch

stammt das im entzündeten Gewebe freigesetzte Zytokin IL-22 zum größten Teil aus NK22-Zellen, einer Subklasse von NK, und den neu charakterisierten T_H-22-Zellen [98]. Unter den T-Helferzellen kann IL-22 von T_H-1-, T_H-17- und T_H-22-Zellen gebildet werden.

IL-22 wird der IL-10-Zytofamiliē zugeordnet und bindet an einen heterodimeren Rezeptor, bestehend aus der IL-10-Rezeptor β -Kette (IL-10R β) und dem IL-22-Rezeptor (IL-22RA) [99]. Im Gegensatz zum ubiquitär exprimierten IL-10R β ist der IL-22-Rezeptor fast ausschließlich auf Nicht-Immunzellen vorhanden [100], sodass IL-22, wie auch IL-17, primär auf Gewebszellen wirkt. Neben diesem zellständigen Rezeptor gibt es zudem einen löslichen IL-22-Rezeptor, *IL-22 binding protein* (IL22-BP) genannt, der vermutlich als Zytokincarrier oder als Zytokinantagonist fungiert [101].

Die Zielzellen von IL-22 sind Zellen aus der Haut, Leber, Niere und des respiratorischen und gastrointestinalen Systems [102]. Dabei reguliert dieses Zytokin vor allem die epitheliale, unspezifische Immunität und nimmt überdies eine wichtige Rolle in entzündlichen Erkrankungen ein. So führt IL-22 zur Expression der antimikrobiellen Peptide β -Defensin 2 und β -Defensin 3 in Epithelzellen der Haut, Lunge und des Gastrointestinaltrakts [103].

In der Auslösung einer nativen Immunantwort in Epithelzellen überlappen die Funktionen von IL-22 und IL-17. IL-17 ist jedoch zum größten Teil eher proinflammatorisch und destruktiv, wohingegen IL-22 primär eine regenerative und protektive Wirkung auf Epithelzellen hat. So induziert IL-22, über eine STAT3-abhängige Hochregulation von anti-apoptotischen und mitogenen Proteinen, Reepithelisation durch verstärkte Migration und Proliferation von Epithelzellen. Diese Effekte können jedoch ins Gegenteil umschlagen. So kann IL-22 in einem proinflammatorischen Kontext synergistisch mit IL-17, TNF- α und IFN- γ wirken. Abhängig von der Natur des betroffenen Gewebes und des lokalen Zytokinmilieus kann IL-22 also entweder eine protektive oder eine pathogene Rolle einnehmen und wird daher auch als ein ambivalentes Zytokin betrachtet [82, 104].

Trotz ihrer überschneidenden Funktion, periphere Gewebe vor Pathogenen zu schützen, ist die biologische Bedeutung von T_H-22- und T_H-17-Zellen verschieden. T_H-17-Zellen schützen die Gewebe, indem sie eine Entzündung auslösen und so neutrophile Granulozyten sowie T-Zellen rekrutieren. Im Gegensatz dazu haben T_H-22-Zellen geringere inflammatorische Eigenschaften. Sie verhindern vor allem den Eintritt des Pathogens in den Körper, indem sie die Integrität der

1. Einleitung

epithelialen Barriere erhalten. Des Weiteren bewirken sie eine Regeneration des Gewebes nach durch Entzündung ausgelösten Schäden.

Aktivierte naive $CD4^+$ -T-Zellen differenzieren in T_H -22-Zellen unter dem Einfluss von IL-6 und TNF- α . Dabei scheinen sie von plasmazytoiden DC unterstützt zu werden [92]. Als für diese Zelllinie wichtiger Transkriptionsfaktor wurde der AHR (*aryl hydrocarbon receptor*) beschrieben, obwohl zusätzliche intrazelluläre Moleküle, die in der T_H -22-Differenzierung involviert sind, noch untersucht werden [92]. AHR-Agonisten können genauso wie IL-6 und IL-23 sowohl in humanen als auch in murinen T-Zellen die Produktion von IL22 auslösen [105, 106]. Da als AHR-Agonisten unter anderem exogene Toxine fungieren wird angenommen, dass IL-22 eine wichtige Rolle in der Antwort auf Umweltfaktoren spielt [82].

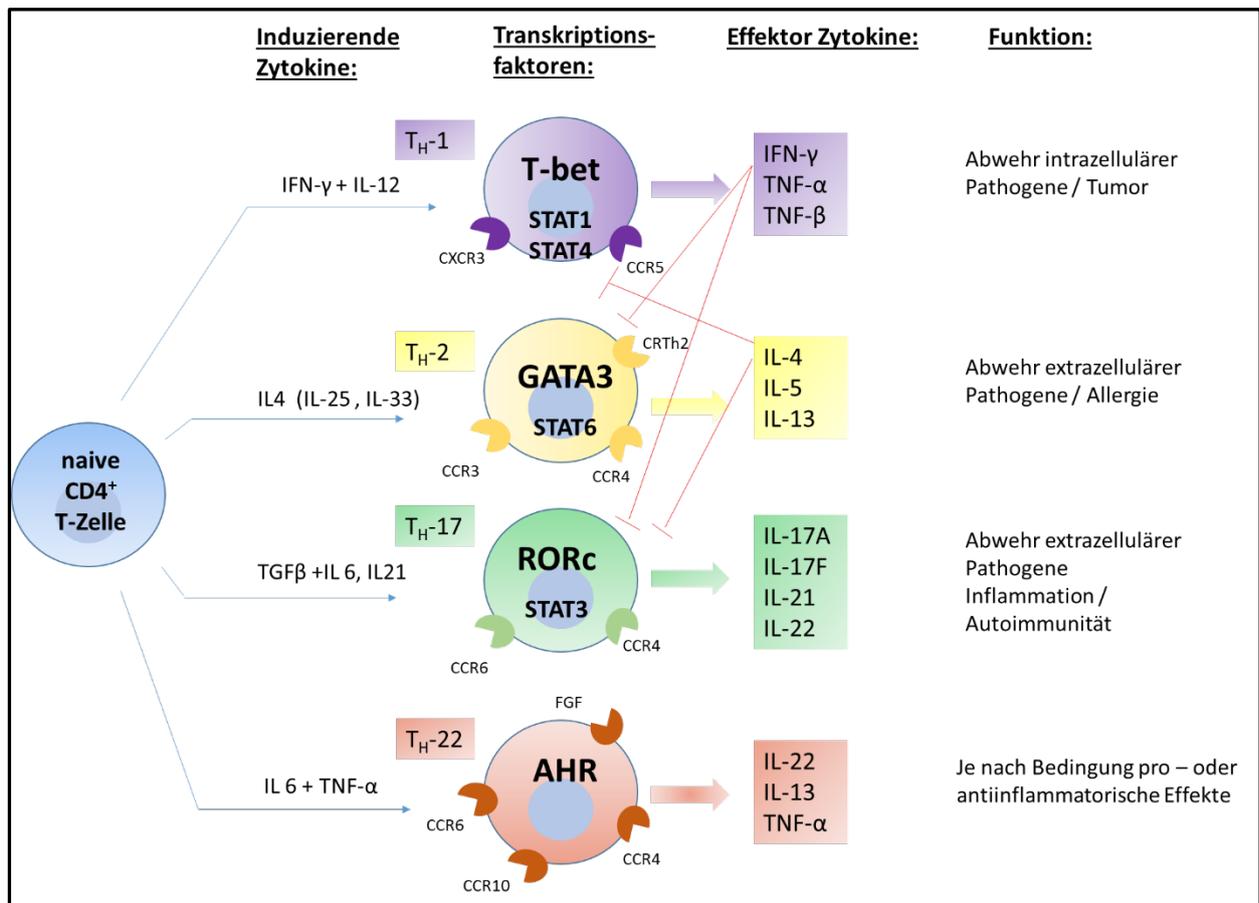


Abbildung 2: Darstellung der verschiedenen T-Helferzell-Subpopulationen

1. Einleitung

Nach Aktivierung der naiven CD4⁺-T-Zelle über APC differenziert diese in Abhängigkeit des Zytokinmilieus in verschiedene T-Helferzellen, T_H-1, T_H-2, T_H-17 und T_H-22 (blaue Pfeile). Charakterisiert werden die jeweiligen T-Zell-Subpopulationen über spezifische Transkriptionsfaktoren, Oberflächenrezeptoren und Effektorzytokine. Die Differenzierungsprozesse können sich gegenseitig über die jeweiligen Effektorzytokine inhibieren (rote Pfeile). Jede Population übernimmt im Immunsystem eine spezielle Aufgabe, die vor allem durch die jeweiligen Zytokine bestimmt wird.

1.2 Die Leber als immunologisches Organ

1.2.1 Funktion und Aufbau der Leber

Die Leber stellt das größte Drüsenorgan im menschlichen Körper dar und ist als metabolisches Hauptorgan für eine Vielzahl von essentiellen physiologischen Stoffwechselfvorgängen verantwortlich. Dazu zählen unter anderem die Energieversorgung durch Aminosäure-, Glukose- und Lipidstoffwechsel, die Produktion von Gerinnungsfaktoren und anderer Peptide sowie die Herstellung und Abgabe von Gallenflüssigkeit und dadurch Abbau und Ausscheidung von Stoffwechselprodukten und Xenobiotika. Neben ihrer metabolischen Funktion ist die Leber auch ein Organ mit wichtigen immunologischen Aufgaben (*vgl. 1.2.2*).

Die humane Leber befindet sich im rechten Oberbauch und besteht aus zwei Leberlappen, welche sich wiederum aus Leberläppchen (Lobuli) zusammensetzen. Diese sechseckigen 1-2mm großen Gebilde sind durch strangartig angeordnete Leberzellen (Hepatozyten) aufgebaut. Zwischen diesen Zellen liegen mit diskontinuierlichen Endothel ausgekleidete mikrovaskuläre Gefäße, die sog. Lebersinusoiden. Darin wird das von der Pfortader bzw. aus der Leberarterie stammende Blut in Richtung der Lobuluszentren drainiert, wo es jeweils von einer Zentralvene aufgenommen wird. Der Großteil der hepatischen Blutversorgung stammt dabei aus der den Gastrointestinaltrakt drainierenden Pfortader (80 %) und nur zu geringem Teil aus der sauerstoffreichen Leberarterie (20 %).

Charakteristisch für die Leber-sinusoidalen Epithelzellen (LSEC) ist neben ihrer Fenestrierung das Fehlen einer Basalmembran. Nur ein schmaler Spalt, auch Dissé-Spalt genannt, trennt die Leberzellen von den Endothelzellen. In diesem Spalt sammelt sich die Lymphflüssigkeit, welche schließlich in die Lymphknoten geleitet wird [107].

Die zelluläre Funktionseinheit der Leberdrüse stellt der Parenchym-bildende Hepatozyt dar, welcher ca. 65-70 % der Zellen in der Leber ausmacht [108]. Hepatozyten sind extrem vielseitige Zellen, die neben ihren metabolischen Eigenschaften auch die Fähigkeit zur Bildung, Speicherung und Freisetzung von energieliefernden Substraten und wichtigen Blutproteinen wie Albumin, Gerinnungsfaktoren oder den bei Infektionen an der frühen Erregerabwehr beteiligten Akute-Phase-Proteinen haben. Daneben produzieren Hepatozyten auch die Galle, über die Fremdstoffe und Stoffwechselprodukte ausgeschieden werden.

Andere in der Leber vorhandenen Zellen werden als nicht-parenchymale Zellen (NPC) bezeichnet. Zu diesen gehören die LSEC, Leber-residente Makrophagen, auch Kupffer-Zellen genannt, Cholangiozyten sowie die fettspeicherenden ITO-Zellen [109]. Des Weiteren werden in der Leber auch dendritische Zellen und Lymphozyten angetroffen.

Unter den NPC bilden die Lymphozyten nach den Endothelzellen mit 25 % die größte Population. Im Gegensatz zu anderen Organen sind in der Leber vor allem die der nativen Immunität zugeordneten NK- und NK-T-Zellen besonders zahlreich vertreten, während gleichzeitig nur wenige B-Zellen aufgefunden werden. Des Weiteren findet sich unter den interhepatischen Lymphozyten mit 15 % ein relativ hoher Anteil an $\gamma\delta$ -T-Zellen. Bei den $\alpha\beta$ -T-Zellen (20 %) ist das Verhältnis von $CD8^+$ - zu $CD4^+$ - sowie von Effektor- zu Gedächtnis-T-Zellen erhöht. Das typische Verhältnis von $CD8^+$ - zu $CD4^+$ -T-Zellen im Blut von 2:3 ist in der Leber umgekehrt [110, 111].

1.2.2 Hepatisches Immunsystem

Die Leber ist ein einzigartiger anatomischer und immunologischer Ort, an welchem Antigenreiches Blut des Gastrointestinaltrakts über die Pfortader durch ein komplexes Netzwerk aus Lebersinusoiden geschleust und dabei kontinuierlich von APC und Lymphozyten gescannt wird. Dabei muss in der Leber immer eine Balance zwischen Regulation und Toleranz gegenüber Metaboliten, Nahrungsantigenen und bakteriellen Produkten auf der einen Seite und der Induktion einer effizienten Immunabwehr gegenüber eingedrungenen Pathogenen auf der anderen Seite gewahrt werden [112].

Die Leber ist sowohl an der nativen wie auch an der adaptiven Immunantwort beteiligt. Das angeborene Immunsystem der Leber besteht aus den nativen Leber-residenten Immunzellen wie den Kupffer-Zellen, DC, NK und NK-T-Zellen sowie von den Hepatozyten-sezernierten humoralen antimikrobiellen Proteinen wie Chemokinen, Akute-Phase-Proteinen und Proteinen des Komplementsystems [113].

Im Rahmen eines inflammatorischen Prozesses produzieren Hepatozyten beispielsweise Akute-Phase-Proteine, C-Reaktives-Protein, IL-6, Fibrinogen und Ferritin, welche entscheidend an der Entstehung von Abwehr- und Entzündungsreaktionen beteiligt sind [114].

Hinsichtlich des adaptiven Immunsystems sind vor allem die intrahepatischen T-Lymphozyten von besonderer Bedeutung. Diese sind nicht nur in den Sinusoiden aufzufinden, sondern können auch über diese in das Leberparenchym migrieren [111]. Dabei scheint die Einwanderung im Gegensatz zu anderen Endothelien, bei denen Selektine eine wichtige Rolle spielen, hauptsächlich über den langsamen Blutfluss und den geringen Durchmesser der fenestrierten Sinusoide zu erfolgen [112, 115, 116]. Wichtig für den Migrationsprozess ist die vorherige Chemokin-abhängige Aktivierung der Lymphozyten. Diese kann unter anderem über die konstitutiv in der Leber exprimierten, aber unter Entzündung hochregulierten Chemokine erfolgen, wie beispielsweise CXCL9 (*monokine induced by gamma interferon, MIG*), CXCL10 (*IFN- γ induces protein 10, IP-10*) oder CXCL11 (*Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant, I-TAC*), welche über die Bindung an den CXCR3-Rezeptor der u.a. auf T_H-1-Zellen exprimiert ist, zu einer Aktivierung dieser Zellen führen [117, 118]. Anschließend können diese Zellen über von den Hepatozyten konstitutiv exprimierte Adhäsionsmoleküle wie z. B. ICAM-1 in die Leber migrieren [119].

Für die Aktivierung der hepatogenen bzw. infiltrierenden naiven CD4⁺-T-Helferzellen werden APC benötigt. In der Leber können verschiedene Zellen diese Funktionen übernehmen. Dazu gehören klassischerweise die verschiedenen DC, Kupffer-Zellen sowie Ito-Zellen. Neben diesen sind auch die LSEC und die Hepatozyten in der Lage, als APC zu fungieren [112]. So exprimieren LSEC konstitutiv MHC-II sowie die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86. Es stellte sich jedoch heraus, dass diese Population nicht dazu in der Lage ist, naive T-Zellen zu aktivieren und eher in der Toleranzinduzierung eine wichtige Rolle spielt [120].

Unter inflammatorischen Bedingungen können auch Hepatozyten MHC-II sowie die für das zweite T-Zell-Aktivierungssignal wichtigen kostimulatorischen Moleküle exprimieren und, im Gegensatz zu den LSEC, auch zu einer T-Zellaktivierung führen [121-123].

Der ständige Kontakt der in der Leber ansässigen Zellen mit zum großen Teil harmlosen Antigenen führt dazu, dass die Leber eine wichtige Rolle bei der systemischen Toleranz spielen muss, um nicht ständig inflammatorische Prozesse auszulösen. Die Leber ist daher reich an immunsuppressiven Zytokinen wie IL-10. Als Konsequenz endet ein Zusammentreffen von T-Zellen und APC in der Leber häufig in Immuntoleranz [124, 125].

Das Immunsystem spielt jedoch auch bei einer Reihe von humanen Lebererkrankungen eine tragende Rolle. So wird eine Leberzellschädigung in der Regel primär nicht durch die auslösende Noxe, sondern sekundär durch die mit der Immunantwort assoziierten Entzündungsreaktionen verursacht. Als zelluläre Quelle dieser Inflammation scheinen bei vielen Leberentzündungen T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle zu spielen [126]. So zeigt sich während der Entwicklung von inflammatorischen Lebererkrankungen ein starker Anstieg der lymphozytären Rekrutierung in die Leber, wobei die Lokalisation dieser infiltrierenden Zellen die Art und das Ausmaß der Erkrankung bestimmt [127].

Neben der direkten Schädigung durch NK- oder CD8⁺-T-Zellen beeinflussen auch die von beteiligten Entzündungszellen sezernierten Zytokine die Zytopathologie der Hepatozyten. Bei vielen Hepatitiden konnten daher erhöhte Zytokinlevel von beispielsweise IFN- γ , TNF- α , IL-4 und IL-10 beobachtet werden [126].

1.2.3 Alkoholische Lebererkrankung

Die Begriff „alkoholische Lebererkrankung“ (*engl. alcoholic liver disease, ALD*) umfasst die hepatischen Manifestationen von chronischem Alkoholabusus, bestehend aus Fettleber, alkoholischer Hepatitis, Leberfibrose bzw. -zirrhose und dem hepatozellulären Karzinom. Da diese Krankheiten meistens in der genannten Abfolge auftreten, werden sie oft auch als Stadien der ALD bezeichnet [128].

ALD ist der häufigste Grund von Zirrhose und Leberversagen in der entwickelten Welt und war im Jahr 2004 weltweit für 3,8 % aller Todesfälle verantwortlich [128]. Trotz der hochgradigen gesundheitlichen und ökonomischen Relevanz dieser Erkrankung wurde seit den frühen Siebzigern, als Kortikosteroide für die Therapie von alkoholischer Hepatitis eingeführt wurden, keine neuen Therapeutika erfolgreich entwickelt [129, 130]. Dies liegt unter anderem daran, dass die Pathogenese der ALD noch nicht komplett verstanden worden ist.

Klar ist, dass Patienten, die chronisch Alkohol missbrauchen, Lebererkrankungen entwickeln. Dies liegt primär daran, dass ein Großteil des aufgenommenen Alkohols in der Leber metabolisiert wird [131]. Der stärkste Beweis für Alkohol als Verursacher von Lebererkrankungen stammt dabei vor allem von epidemiologischen Daten und nicht von biochemischen oder klinischen Studien.

Generell akzeptiert ist, dass die Aktivierung des Immunsystems mit einer gesteigerten Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und anderer Mediatoren eine wichtige Rolle in der Entwicklung von ALD spielt. Die dazu führenden Mechanismen sind jedoch immer noch nicht klar. Es werden dazu primär zwei Pathomechanismen diskutiert [132].

Der eine geht davon aus, dass die durch Alkohol geschädigte Mukosa des oberen Gastrointestinaltrakts für Markromoleküle wie LPS durchlässig wird [133]. Die daraus resultierende Endotoxämie in der Portalvene führt zur TLR-4-abhängigen Aktivierung von Kupffer-Zellen und anderer Makrophagen in der Leber. Die anschließende Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, sowie die Infiltration von anderen Immunzellen, wie Lymphozyten oder Neutrophilen, führen letztendlich zum Leberschaden. So werden in der alkoholischen Hepatitis (AH) vermehrt parenchymale Neutrophile angetroffen, deren Anzahl auch mit dem Grad dieser Erkrankung positiv korreliert. Die Zellen werden vor allem über die Hochregulation von CXCL-1 und CXCL-8 in die Leber gelockt [134, 135].

Der andere Pathomechanismus geht davon aus, dass die Alkoholoxidation metabolische Veränderungen in der Zelle hervorruft. Der Ethanol-Metabolismus sorgt dabei nicht nur über die gesteigerte Reduktion von NAD^+ für ein Redoxchaos in den Hepatozyten, sondern generiert überdies reaktive Sauerstoffradikale, welche zu Lipidperoxidation und mitochondrialer Glutathion Depletion führen. Dies macht die Zelle letztendlich für Schäden empfindlicher und kann auch direkt zur Zellnekrose mit Auslösung einer Entzündungsreaktion führen [130, 131]. Die durch den Ethanolmetabolismus veränderten Proteine werden vom Immunsystem als sog. „gefährliche

Moleküle“ (*engl. danger-associated molecular patterns, DAMPs*) wahrgenommen und können durch Interaktion mit PRRs Immunzellen aktivieren und eine Entzündung auslösen [136].

Festzuhalten bleibt, dass die Entwicklung einer hepatischen Entzündung ein entscheidender Aspekt der ALD ist, in der mit der Einwanderung von nativen und adaptiven Immunzellen eine Kaskade von verschiedenen Mechanismen initiiert wird, die letztendlich über den Tod von Hepatozyten zu Leberfibrose bzw. -zirrhose führt.

Während die Rolle des unspezifischen Immunsystems in der ALD immer mehr verstanden wird, ist noch wenig über die Beteiligung der adaptiven Immunität an dieser Erkrankung bekannt. Das auch diese in der ALD involviert ist, zeigen jedoch mehrere klinische und experimentelle Daten [137]. So finden sich im Blut von Patienten mit fortgeschrittener ALD zirkulierende IgG-Antikörper und T-Lymphozyten, die spezifisch auf die Erkennung von bestimmten, durch den Ethanolmetabolismus entstehenden, Epitope sind. Zu diesen zählen beispielsweise durch Hydroxyethyl-freie Radikale modifizierte Proteine oder Produkte der Lipidperoxidation [137]. Des Weiteren findet sich in der Leber bei AH auch eine erhöhte Anzahl von T-Zellen [130]. Der Mechanismus, der zu einer Aktivierung des adaptiven Immunsystems führt, ist jedoch noch nicht genau bekannt [137].

2. Ziel der Arbeit

Die Eckpfeiler in der Therapie für alkoholische Hepatitis haben sich seit 40 Jahren nicht mehr verändert, obwohl sowohl aus gesundheitlichen wie auch ökonomischen Gründen eine akute Notwendigkeit für neue Behandlungsmöglichkeiten besteht. Um neue therapeutische Ansatzpunkte zu entwickeln, ist es wichtig, die noch nicht vollständig verstandene Pathophysiologie alkoholischer Lebererkrankungen zu erforschen. Mehrere Studien zeigen, dass das Immunsystem in der Entwicklung und Aufrechterhaltung dieser Erkrankung eine entscheidende Rolle einnimmt. Bisher wurde jedoch vor allem die Funktion des nativen Immunsystems erforscht, wohingegen der Einfluss von T-Zellen auf die ALD noch kaum bekannt ist. Eine erhöhte Anzahl von hepatischen T-Lymphozyten in dieser Erkrankung zeigt jedoch, dass diese Zellen eine wichtige Rolle zu spielen scheinen.

Diese Arbeit widmet sich daher speziell den immunologischen Vorgängen in der Interaktion von T-Helferzellen und Leberzellen vor dem Hintergrund einer ALD. Dabei sollen prinzipiell drei Vorgänge beleuchtet werden:

- A. Effekte von T-Helferzellen in der Leber
- B. Einfluss eines alkoholischen Lebermikromilieus auf T-Zellen (CD4⁺-Zellen)
- C. Einfluss von IL-22 und IFN- γ auf die MHC-I-Expression primärer Hepatozyten

Ad A) Es soll aus einer zirrhotischen humanen Leber eine T-Zelllinie etabliert und aus dieser sollen durch Klonierung einzelne T-Helferzell-Subtypen erhalten werden. Anschließend soll der Einfluss der verschiedenen T-Helferzell-Klone auf die Leber untersucht werden. Dabei liegt eine besondere Gewichtung auf den in der Haut neu entdeckten T_H-22-Zellen und ihrem Effektorzytokin IL-22.

Ad B) Es soll untersucht werden, welchen Einfluss ein alkoholisches Lebermilieu auf die Zytokinproduktion von CD4⁺-Zellen hat.

Ad C) Es soll untersucht werden, welchen Effekt IL-22 und IFN- γ auf die Expression des MHC-I-Moleküls in der Leber haben.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Probanden

Erwachsenen Probanden ohne vorhandene Systemerkrankung wurde zur Isolation von PBMC (peripheral blood mononuclear cells), nach erfolgter Einwilligungserklärung, venöses Blut aus der Armbeuge abgenommen.

3.1.2 Zelllinien

HepG2:

humane hepatozelluläre Karzinomzelllinie, ATCC-Nr. HB-8065, 1975 etabliert (Aden et al., 1979), epithelartige Zellen, adhärent als Monolayer wachsend, Verdopplungszeit 48-60 h, in der Arbeit verwendete Zellpassagen P11 – P21;

h NHEPS™:

NHEPS™-Zellen (Normal Human Primary Hepatocytes) sind primäre humane Hepatozyten, isoliert von einzelnen nicht transplantationsfähigen Spendern, adhärent als Monolayer wachsend, nur sehr begrenzt proliferationsfähig;

Bezugsquelle der Zellen sowie der dazugehörigen Medien ist die Firma Lonza, Köln (Best.-Nr. CC-2591)

3.1.3 Substanzen

Substanz	Bezugsquelle und Bestellnummer
2-Mercapto-Ethanol	Sigma, München Best.-Nr. M-7522

3. Material und Methoden

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (Liquid Substrate System for ELISA)	Sigma, München Best.-Nr. T0440-100ML
Albumin, bovine (BSA)	Sigma, München Best.-Nr. A-8806
antiCD4-FITC Antikörper	BD Biosciences, Heidelberg Best.-Nr. 555 346
antiCD8-PE Antikörper	BD Biosciences, Heidelberg Best.-Nr. 555 635
antiCD3 Antikörper	BD Biosciences, Heidelberg Best.-Nr. 555 329
antiCD28 Antikörper	BD Biosciences, Heidelberg Best.-Nr. 555 752
Adenin	Sigma, München Best.-Nr. A-9795
Aqua ad injectabilia	Delta-Select, Pfullingen Best.-Nr. EDS192F-607
Brefeldin A (BFA)	Sigma, München Best.-Nr. B7651-5MG
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche Diagnostics, Mannheim Best.-Nr. 11 644 793 001
DMSO (Dimethyl-Sulfoxid)	Baker, Griesheim Best.-Nr. 7157
DMEM	Invitrogen, Paisley, Schottland Best.-Nr. 41966-029
DPBS Ca/Mg	Invitrogen, Paisley, Schottland Best.-Nr. 14040174
DPBS w/o Ca/Mg	Invitrogen, Paisley, Schottland Best.-Nr. 14190094
EDTA	Sigma, München Best.-Nr. ED4SS
EDTA 0,5M	Invitrogen, Paisley, Schottland Best.-Nr. 15575-020
ELISA Kit (IL4, IL-10)	BD Biosciences, Heidelberg
ELISA Kit (IL-17, IL22, IFN- γ , IL-10, TNF- α)	RD

3. Material und Methoden

Ethanol	Sigma Best.-Nr. 200-578-6
FACS-Flow	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland Best.-Nr. 342003
Fetal bovine serum (FBS)	Perbio, Bonn
Gentamycin	Invitrogen, Paisley, Schottland Best.-Nr. 15710049
Glucose	Sigma, München Best.-Nr. G-7528
Heparin-Natrium 250.000U	Ratiopharm, Ulm Best.-Nr. X68541.02
Humanes Serum	Invitrogen, Paisley, Schottland Best.-Nr. H4522
Hydrocortison	Sigma, München Best.-Nr. C-31059
Ionomycin	Sigma, München Best.-Nr. I9657-1MG
Kollagen	Invitrogen, Paisley, Schottland Best.-Nr. 5018
L-Glutamin	Invitrogen, Paisley, Schottland Best.-Nr. 25030-024
Lymphoprep	Progen Biotechnik, Heidelberg Best.-Nr. 111 4547
MACS Beads CD8	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach Best.-Nr. 130-045-201
MACS Beads CD4	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach Best.-Nr. 130-045-101
MACS Beads IL-17 Secretion Assay	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach Best.-Nr. 130-094-542
MACS Rinsing Solution	Mytlenyi, Bergisch Gladbach Best.-Nr. 130-091-222
MACS Running Buffer	Mytlenyi, Bergisch Gladbach Best.-Nr. 130-091-221
MACS Pro Washing Solution	Mytlenyi, Bergisch Gladbach Best.-Nr. 130-092-987
Mitomycin C	Sigma, München

3. Material und Methoden

	Best.-Nr. 037K1522
Monensin	Sigma, München Best.-Nr. M5273-500MG
Na-Pyruvat	Invitrogen, Paisley, Schottland Best.-Nr. 11360-039
“Non-essential Amino Acids”	Invitrogen, Paisley, Schottland Best.-Nr. 11140-35
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Paisley, Schottland Best.-Nr. 15140130
PHA (Lectin)	Sigma, München Best.-Nr. L-9132
PMA	Sigma, München Best.-Nr. P8139-1MG
Poly-L-Lysin-Lösung	Sigma, München Best.-Nr. P-8920
rIL-2	R&D, Wiesbaden Best.-Nr. 202-1L-010
rIL-22	R&D, Wiesbaden Best.-Nr. 1316-RL-010
rIFN- γ	R&D, Wiesbaden Best.-Nr. 285-IF
rTNF- α	R&D, Wiesbaden Best.-Nr. 510-RT-010
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden Best.-Nr. 74106
RPMI 1640 + L-Glutamin	Invitrogen, Paisley, Schottland Best.-Nr. 31870-025
Trypan Blau 0,4% Lösung	Sigma, München Best.-Nr. T-8154
Trypsin 0,05% EDTA	Invitrogen, Paisley, Schottland Best.-Nr. 2530054
Tween 20 Detergent	Merck, Darmstadt Best.-Nr. 655205

3. Material und Methoden

3.1.4 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle und Bestellnummer
384-well Mikrotiterplatten T-Form steril	Nalgene Nunc, Rochester, USA Best.-Nr. 242765
96-well Mikrotiterplatten T-Form steril	Nunc, Roskilde, Dänemark Best.-Nr. 167008
96-well Mikrotiterplatten U-Form steril	Nunc, Roskilde, Dänemark Best.-Nr. 163320
96-well Mikrotiterplatten für ELISA	Nunc, Roskilde, Dänemark Best.-Nr. 449824
24-well Mikrotiterplatten	Nunc, Roskilde, Dänemark Best.-Nr. 280933
12-well Mikrotiterplatten	Nunc, Roskilde, Dänemark Best.-Nr.
6-well Mikrotiterplatten	Nunc, Roskilde, Dänemark Best.-Nr. 108037
Chamber Slide	Nunc, Roskilde, Dänemark Best.-Nr. 155411
Clustertubes 1,2ml	Abgene, Surrey, UK Best.-Nr. AB-0672
Cryoröhrchen 1,8ml Außengewinde	Nunc, Roskilde, Dänemark Best.-Nr. 375418
EDTA-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht Best.-Nr. 02/1066.001
Eppendorf-Tubes	Eppendorf, Hamburg Best.-Nr. 0030 015.002
Falcon Röhrchen 15 ml	Becton Dickinson, NJ, USA Best.-Nr. 352070
Falcon Röhrchen 50 ml	Becton Dickinson, NJ, USA Best.-Nr. 2096
“Heat sealing paper”	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim Best.-Nr. 1450-467
Kapillarspalt-Objektträger 100µm	Dako, Hamburg Best.-Nr. S2025
LS-Säulen (MACS Separation Columns)	Miltenyi, Bergisch-Gladbach Best.-Nr. 130-041-306
Serum-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht Best.-Nr. 02.1063.500
Sterilfiltereinheiten 250ml	Nalgene, Rochester, USA Best.-Nr. 1680020
Sterilfiltereinheiten 500ml	Nalgene, Rochester, USA Best.-Nr. 1690020

3.1.5 Geräte

3. Material und Methoden

Gerät	Hersteller
Auto-MACSTM Pro	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
ELISA-Reader	MRXTC Revelation, Dynex, Berlin
FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Feinwaage	MCI Research, Sartorius, Göttingen
Lichtmikroskop Axiovert 25	Fa. Zeiss, Jena
Multipette	Eppendorf, Hamburg
NanoDrop	Peqlab, Erlangen
PCR-Gerät (Thermocycler) TC-412	Techne, Staffordshire
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Viiia 7 Real Time PCR System	Life Technologies
Schüttler Titramax 100,	Heidolph, Schwabach
Waage MC1Labor	Sartorius, Göttingen
Wasserbad Typ1003	GFL, Burgwedel
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau

3.1.6 Verwendete Medien

HepG2-Medium

450ml DMEM, 50ml FCS, 5ml Pen/Strep, 5ml Nicht-essentielle-Aminosäuren, 5ml Glutamin, 5ml Na- Pyruvat

hNHeps-Medium (Lonza, Köln Best.-Nr. CC-2591S)

Hepatozyten Kultur Medium BulletKit™: 500ml Hepatozyten Basal Medium (HBM Medium™), 0,5ml Ascorbinsäure, 10ml BSA, 0,5ml Hydrocortison, 0,5ml hEGF, 0,5ml Transferrin, 0,5ml Insulin und 0,5ml Gentamycin/Amphotericin-B

Hepatozyten Erhaltungs Medium: 500ml Hepatozyten Basal Medium (HBM Medium™), 0,5ml Dexamethason, 0,5ml Insulin und 0,5ml Gentamycin/Amphotericin-B

FACS-Puffer

500ml DPBS Dulbecco's w/o Ca/Mg, 0,02 % Na-Azid, 5 % FCS

3. Material und Methoden

Lagerung bei 4-8°C

Kloniermedium

Ansatz RPMI compl. (s.u.), 25ml Humanes Serum (= 5 %), 50ml FCS (30min bei 56°C im Wasserbad hitzeinaktiviert) (= 10 %), 5ml *Antibiotic-Antimycotic-Solution* (1 %)

Sterilfiltriert, Lagerung bei 4-8°C, Verbrauch innerhalb von 7 Tagen

MACS-Puffer

500ml DPBS Dulbecco's w/o Ca/Mg, 2mM EDTA , 2,5g BSA (0,5 %)

Sterilfiltriert, vor Gebrauch entgast (Inkubation im Schüttler für 15min), Lagerung bei 4-8°C

Mitomycin-Lösung

Mitomycin C 2mg

Stock-Lösung (500µg/ml): mit 4ml DPBS (+Ca²⁺/Mg²⁺) direkt in der Flasche lösen.

Lagerung bei 4°C lichtgeschützt

Gebrauchslösung: 2 % in RPMI 1640 Medium verdünnt, sterilfiltriert

Proliferationsmedium (RPMI-Medium complete 5 % humanes Serum)

450ml RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin, 28ml humanes Serum, 5ml L-Glutamin, 5,6ml Nonessential Aminoacids (1 %), 5ml Na-Pyruvat (1 %), 500µl 50mM 2-Mercaptoethanol

Sterilfiltriert, Lagerung bei 4-8°C, Verbrauch innerhalb von 7 Tagen

3.2 Methoden

3.2.1 Isolierung und Kultivierung von primären humanen Zellen

3.2.1.1 Generierung spezifischer T-Zellklone aus einer Leberprobe

Schritt 1 : Etablierung einer T-Zelllinie aus einer Leberprobe

Die zur Isolierung einer T-Zelllinie verwendeten Leberproben stellten humane, Alkohol-bedingt zirrhotische Leberanteile dar.

Diese wurden im ersten Schritt auf eine Größe von ca. 4mm³ kleingeschnitten und in eine 24-kämmrige Mikrotiterplatte (MTP) gegeben. An der MTP wurden einen Tag zuvor an den Vertiefungen antiCD3-Antikörper (1 µg/ml in DPBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺, 4°C, ÜN) gebunden. Die Leberprobe wurde daraufhin zusammen mit IL-2 (60U/ml) und dem antiCD28-Antikörper (1µg/ml) in Proliferationsmedium auf die vorbereiteten Platten gegeben.

Da zuerst eine Migration der Erythrozyten aus der Leberprobe erfolgte, wurde diese nach 24 Stunden, wie oben beschrieben, auf eine neue MTP versetzt. Nach ca. 7-10 Tagen, als die Vertiefung 60-70 % mit Zellen gefüllt war, wurde diese 1:2 geteilt und die Zellen wurden weiter mit IL-2 expandiert.

Um auch die spät auswandernden Zellen zu erhalten, wurde die Leberprobe weitere 11 Tage in der Vertiefung belassen. Es wurde also zwischen früh und spät ausgewanderten Zellen unterschieden. Die erhaltenen Zellen wurden alle drei Wochen mit antiCD3 und antiCD28 restimuliert und schließlich durchflusszytometrisch charakterisiert (vgl. 3.2.3.1.2) und bei -80°C weggefroren.

Schritt 2: Anreicherung von T_H-22-Zellen in der etablierten T-Zelllinie

Ein Teil dieser Arbeit zielt vor allem darauf ab, die Wirkung von T_H-22-Zellen in der Leber zu untersuchen. Um bei der Generierung spezifischer T-Zellklone die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, T_H-22-Zellen zu erhalten, wurde bei der etablierten T-Zelllinie noch vor der Klonierung ein sog. „IL-17 Secretion Assay“ durchgeführt.

Das Prinzip dieser Anwendung ist es, IL-17-produzierende Zellen von den anderen Zellen abzutrennen. Da T_H-22-Zellen als IL-17-negative Zellen definiert sind, erhält man dadurch eine T-Zellpopulation mit einem prozentual höheren Anteil an T_H-22-Zellen.

Dazu wurden eine Woche nach Ansetzen der Leber-T-Zell-Linie ca. vier Millionen T-Zellen für dreieinhalb Stunden mit 2 % PHA versetzt und somit unspezifisch aktiviert. Nach dieser Stimulation wurden die Zellen in MACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert, in 80µl Proliferationsmedium resuspendiert und für fünf Minuten auf Eis mit 20µl des sog. IL-17-Abfang-Reagenz versetzt. Dabei handelt es sich um einen antiCD45-Antikörper, der mit einem antiIL-17A-Antikörper konjugiert ist. CD45 ist ein auf allen Leukozyten vorhandenes

3. Material und Methoden

Oberflächenmolekül und damit ein Pan-Leukozytenmarker. Durch dieses Reagenz wurden also alle T-Zellen in der Lösung markiert.

Als nächstes wurde zu dieser Suspension pro 10^6 Zellen/ml 10ml Proliferationsmedium gegeben und für eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit produzierten die IL-17-positiven T-Zellen IL-17, welches an den antiIL-17A-Antikörper binden konnte. Um eine Kreuzkontamination mit IL-17-negativen Zellen zu verhindern, wurden die Zellen alle fünf Minuten vorsichtig geschüttelt.

Daraufhin wurden die T-Zellen wieder in MACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert, in $80\mu\text{l}$ MACS-Puffer resuspendiert und zehn Minuten auf Eis mit $20\mu\text{l}$ des IL-17-Detektions-Antikörper inkubiert. Hierbei handelt es sich um einen anti-IL-17A-Antikörper, der mit PE (R-phycoerythrin) konjugiert ist.

Nach einem erneuten Waschgang wurden die Zellen in $80\mu\text{l}$ MACS-Puffer resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis mit $20\mu\text{l}$ eines „Anti-PE MicroBead“ versetzt. Bei diesem handelt es sich um einen antiPE-Antikörper, der mit einem *MicroBead* verbunden ist. *MicroBeads* sind superparamagnetische Partikel mit einem Durchmesser von 50nm. Diese bestehen aus biologisch abbaubarem Material, so dass ein Entfernen der *MicroBeads* nach der Zellseparation nicht nötig ist.

Folgende Abbildung soll nochmals das Prinzip des „IL-17 Secretion Assay“ veranschaulichen:

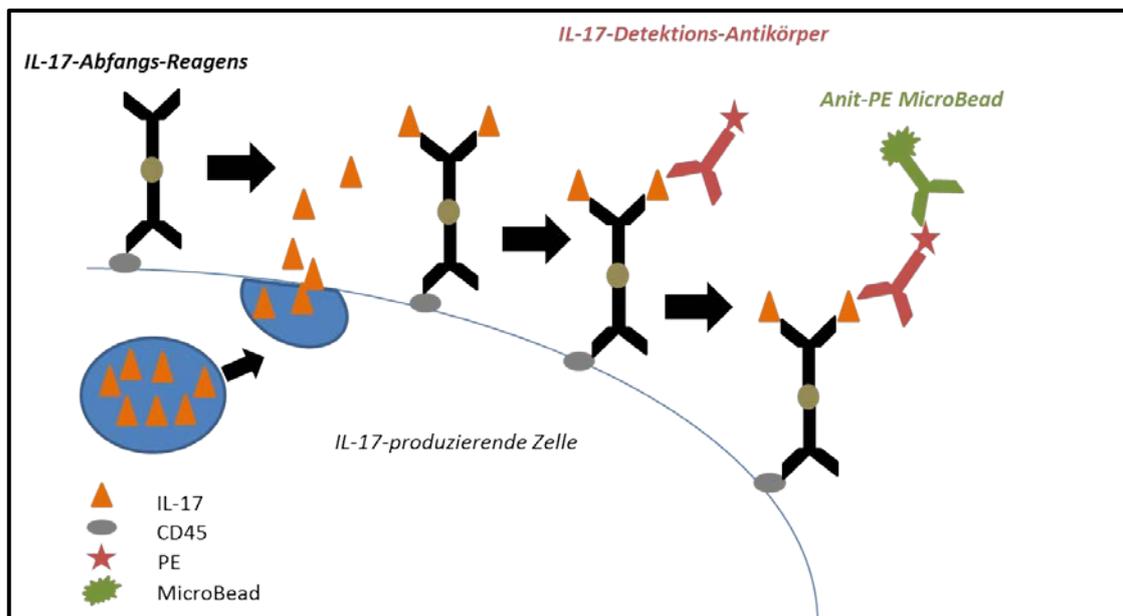


Abbildung 3: Ablauf des IL-17 Secretion Assays

Die so markierten T-Zellen wurden mittels *Magnetically Activated Cell Sorting* (MACS™) in IL-17-positive und IL-17-negative Zellen aufgetrennt.

Bei diesem System werden die mit *MicroBeads* markierten Zellen zunächst auf eine Säulenmatrix geladen, welche sich in einem starken Magnetfeld befindet. Durch das Magnetfeld werden die mit magnetischen Antikörpern markierten Zellen auf der Säule zurückgehalten, während nicht markierte Zellen im Durchfluss verbleiben. Demnach sind sowohl eine Positiv- als auch eine Negativ-Isolation von Zellen möglich. Nach intensivem Waschen der Säule wird diese aus dem Magnetfeld entfernt und die markierten Zellen können eluiert und aus der Säule in ein Gefäß transferiert werden. Bei der manuellen Separation erfolgt die Elution durch Druck mit Hilfe eines Stempels. Bei der Separation mittels AutoMACS™ erfolgen die Aufnahme der Probe, der Transport auf die Säule sowie die Elution mittels eines hydraulischen Pumpensystems. Die Magneten werden durch einen Elektromotor in Stellung gebracht.

Für die Klonierung der T-Zelllinie wurde die negativ-Fraktion verwendet, da sich in dieser ein höheres Kontingent an T_H-22-Zellen befand. Da der IL-17-Detektions-Antikörper an PE gebunden ist, konnte der Erfolg des Versuches nach der magnetischen Separation im Durchflusszytometer überprüft werden.

Schritt 3: Klonierung, Expansion der Klone (Tag 7-21)

Ziel der Klonierung ist es, einzelne Zellen der etablierten T-Zell-Linie zur Expansion zu bringen und so verschiedene T-Zellklone zu gewinnen.

Dazu wurden die IL-17-dezimierte T-Zellen durch Reihenverdünnung auf eine Konzentration gebracht, die einem statistischen Wert von 0,6 bzw. 0,8 Zellen pro Plattenvertiefung entspricht. Bei gleichmäßiger Aussaat in 96-well Platten müsste sich dementsprechend in sechs bzw. acht von zehn Vertiefungen jeweils eine Zelle befinden. Aus dieser einzelnen Mutterzelle entstehen durch klonale Expansion Tochterzellen mit der gleichen genetischen Information und damit ein T-Zellklon.

Einzelne Zellen würden jedoch alleine im Medium nicht überleben, deswegen werden ihnen teilungsunfähig gemachte PBMC, sog. „Feederzellen“, zugegeben.

Zur Isolation dieser Zellen wurde zunächst einem Probanden 300ml Vollblut aus einer Armvene in heparinisierte 50ml-Spritzen entnommen. Hieraus wurden PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert.

Bei dieser Methode wurde das Blut zunächst in DPBS w/o Ca^{2+} / Mg^{2+} auf 600ml verdünnt. Je 25ml dieser Suspension wurde in einem 50ml Falcon-Röhrchen auf 15ml Lymphoprep Trennmedium vorsichtig überschichtet. Da die Dichte dieses Mediums genau zwischen der von Erythrozyten und PBMC (periphere blood mononuclear cells, also Monozyten, NK-Zellen, T- und B-Zellen) liegt, bildeten sich nach 15-minütiger Zentrifugation mit 2200rpm ohne Bremse folgende nach ihrer unterschiedlichen Dichte aufgetrennte Banden:

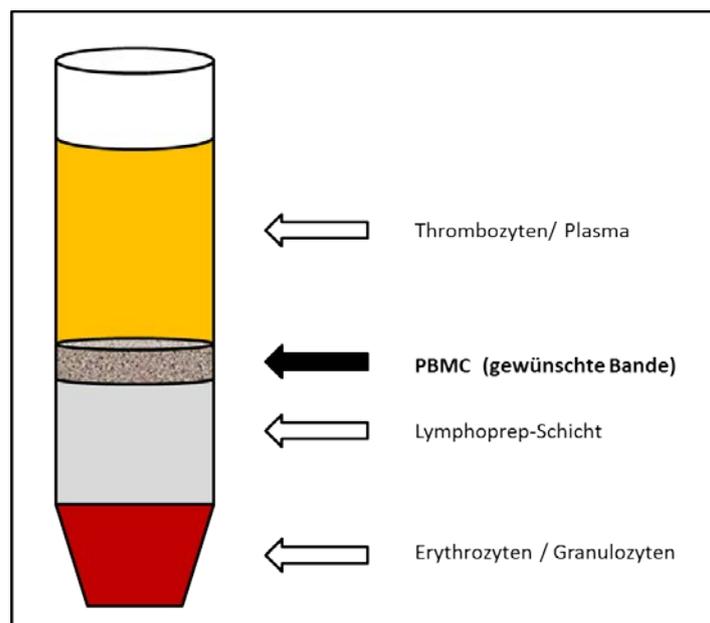


Abbildung 4: Auftrennung des Blutes in seine verschiedenen Bestandteile mittels Zentrifugation unter Verwendung von Lymphoprep

Die Banden der PBMC von jeweils zwei Röhrchen wurden vorsichtig aspiriert, in ein 50ml Falcon-Röhrchen gegeben und in DPBS w/o Ca^{2+} / Mg^{2+} gewaschen (Zentrifugation mit 1600rpm für 20 Minuten). Daraufhin wurden die Zellpellets so zusammengeführt, dass sich nach wiederholtem

zweimaligem Waschgang in DPBS w/o Ca^{2+} / Mg^{2+} (Zentrifugation mit 1200rpm für 10 Minuten) alle Zellen in einem 50ml Falcon-Röhrchen befanden.

Um zu verhindern, dass die PBMC die T-Zellklone überwachsen, wurden sie teilungsunfähig gemacht. Dazu wurden die aus dem Blut isolierten PBMC 90 Minuten im Inkubator mit einer 4 %igen Mitomycin C-Lösung behandelt. Mitomycin C ist ein Spindelgift, welches die Polymerisierung von Aktinfilamenten verhindert und damit die Trennung der autologen Chromsomenpaare während der Metaphase der Mitose blockiert. Die Zellen können sich infolgedessen nicht mehr teilen, sind aber für einen begrenzten Zeitraum noch vital und in der Lage, Zytokine zu produzieren. Damit dienen sie den vereinzelt T-Zellen als eine Art „Nährzelle“ (Feederzellen).

Nach der 90-minütigen Inkubation wurde die Reaktion mit einem FCS-haltigen Medium abgestoppt. Um einen Einfluss des Mitomycins auf die zu klonierenden T-Zellen auszuschließen, wurden die PBMC dreimal vorsichtig mit DPBS w/o Ca^{2+} / Mg^{2+} gewaschen, wobei der Überstand gesondert entsorgt wurde.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot (10 μ l) der teilungsunfähig gemachten PBMC in 90 μ l 0,5 % Trypan-Blau aufgenommen. 10 μ l dieser Suspension wurden in einer Neubauer-Zählkammer durch Auszählen aller vitalen Zellen in den vier Eckquadraten unter einem Phasenkontrastmikroskop quantifiziert. Die Gesamtzellzahl pro ml berechnete sich aus dem Durchschnitt der Zellen pro Quadrat mal dem Verdünnungsfaktor (10) und mal der Kammertiefe (10000). Anschließend wurden die PBMC auf eine Konzentration von $3,5 \times 10^6$ Zellen pro ml in Kloniermedium eingestellt.

Diese Suspension wurde zusätzlich mit 2 % PHA (1 g/ml) und 200 U/ml IL-2 versetzt. Durch die Zugabe dieser beiden Substanzen wurde sichergestellt, dass die einzeln ausgesäten T-Zellen einen maximalen Wachstumsstimulus erhalten.

100 μ l dieser Suspension wurden jeweils in eine Vertiefung einer 96-well Mikrotiterplatte gegeben.

Um die etablierte T-Zell-Linie aus der Leber auf die für die Klonierung geeignete Konzentration zu bringen, wurden die Zellen in einer Reihenverdünnung mit RPMI-Medium jeweils 1:2 verdünnt und mittels Nativ-Färbung so lange gezählt, bis die absolute Zellzahl im entnommenen Aliquot

noch mindestens acht Zellen betrug. Acht gezählte Zellen in den vier Eckquadraten entsprachen beispielsweise:

$$8 \times 0,25 \times 10^4 = 2 \times 10^4 \text{ Zellen/ml der Suspension}$$

Anschließend wurde diese Zellsuspension in zwei Schritten je 1:10 verdünnt, so dass sich im obigen Beispiel eine Endkonzentration von 200 Zellen/ml ergeben hätte. Daraufhin wurden die T-Zellen auf eine Konzentration von 8 Zellen/ml in Kloniermedium eingestellt. Im Beispiel würden also von der Suspension mit der größten Verdünnung (200 Zellen/ml) 900µl entnommen und in 29,1ml Kloniermedium resuspendiert.

100µl dieser Suspension wurden zu den 100µl „Nährzellen“ gegeben, was einer Verteilung von 0,8 Zellen pro Vertiefung entsprach. Die so maximal stimulierten, in teilungsunfähige „Nährzellen“ eingebetteten einzelnen vitalen T-Zellen wurden für sieben Tage bei 37°C inkubiert.

Zu diesem Zeitpunkt waren erste proliferierende T-Zellklone erkennbar. Mikroskopisch waren wasserklare, birnenförmige vitale Zellen zu betrachten, die sich nach einigen Tagen zu einem makroskopisch erkennbaren T-Zellklon vermehrten.

Um einen neuen Wachstumsstimulus zu erhalten, benötigten die heranwachsenden Klone sieben Tage nach der Klonierung neue „Nährzellen“. Dazu wurden, wie bereits oben beschrieben, PBMC aus dem Blut isoliert und teilungsunfähig gemacht, jedoch diesmal nur mit IL-2 und nicht mit PHA versetzt. Anschließend wurden 100µl des Klonüberstandes vorsichtig entnommen (ohne dabei das Zellpellet zu berühren) und dafür 100µl der neuen „Nährzellen“ zu den Klonen hinzugegeben.

Ab diesem Zeitpunkt wurde alle zwei Tage ein Mediumwechsel durchgeführt, d. h. 100µl des alten Mediums wurden vorsichtig abgenommen und durch neues Kloniermedium mit zugesetztem IL-2 (60-80 U/ml final, je nach Wachstumsverhalten des jeweiligen Klones) ersetzt. Klone, die eine Vertiefung bis zu ca. 70 % bewachsen hatten, wurden 1:2 geteilt und weiter expandiert.

3.2.1.2 Charakterisierung und Expansion der T-Zell-Klone

Um eine Aussage über den T-Zellsubtyp der erhaltenen T-Zellklone zu treffen, wurden die T-Zellklone durchflusszytometrisch und mittels ELISA hinsichtlich ihres Zytokinmusters untersucht.

Dazu wurde, nachdem ein Klon vier Vertiefungen einer MTP mit 96 Kammern ausfüllte, die Hälfte der Zellen für eine Charakterisierung mittels Durchflusszytometrie herangezogen (*vgl. 3.2.3.1.2*).

Die andere Hälfte wurde weiter expandiert. Die Expansion erfolgte hierbei nach einem dem Wachstumsverhalten angepassten flexiblen Muster, bei welchem alle zwei Tage ein Medienwechsel mit Zugabe von IL-2 und alle vier Wochen eine Restimulation mit antiCD3 und antiCD28 durchgeführt wurden.

Für die Restimulation wurde einen Tag zuvor an den Vertiefungen einer 96- bzw. 24-kämmrigen MTP antiCD3-Antikörper (1 µg/ml in DPBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺, 4°C, ÜN) gebunden. Die Klone wurden daraufhin zusammen mit IL-2 (60U/ml) und dem antiCD28-Antikörper (1µg/ml) auf die vorbereiteten Platten gegeben.

Zwei Tage nach einer Restimulation wurde von jedem Klon Überstand asserviert und für die Analyse der Zytokinproduktion (IFN-γ, IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, IL-22, TNF-α und IL-5) im ELISA bei -80°C eingefroren (*vgl. 3.2.3.3*).

Hatte der proliferierende Klon erneut vier Vertiefungen bewachsen, wurde er auf eine Vertiefung einer MTP mit 24 Kammern überführt (Gesamtvolumen 2 ml) und weiter expandiert, bis ausreichend Zellen zur Asservierung in flüssigem Stickstoff und für weitere Experimente zur Verfügung standen.

Schließlich wurden die T-Zellklone in einer MTP mit sechs Kammern in den Ruhezustand gebracht und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.2.1.3 Isolierung von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen

Von zuvor aus Vollblut isolierten PBMC wurden mit magnetischen Antikörpern (MACS-System) durch positiv-Selektionen CD4⁺ und CD8⁺-Zellen isoliert (*Prinzip MACS vgl. 3.2.1.1 Schritt 2*).

Dafür wurden die PBMC zunächst gezählt und zentrifugiert. Per 10⁷ Zellen wurde das Pellet in 80µl entgasten MACS-Puffer und in 20µl CD4 bzw. CD8 *beads*-Suspension aufgenommen und für 15 Minuten bei 4-8°C inkubiert. Anschließend konnten mittels positiv-Selektion im AutoMACSTM CD4⁺ bzw. CD8⁺-Zellen isoliert werden.

Diese wurden entweder sofort in folgenden Experimenten weiterverwendet oder übergangsweise über Nacht bei 4-8°C im Proliferationsmedium aufbewahrt.

3.2.1.4 Kultivierung der humanen Leberkarzinomzelllinie HepG2

HepG2-Zellen (ATCC HB-8065) wurden mit einer Konzentration von $4 \times 10^4/\text{cm}^2$ ausgesät und in dem für sie spezifischen Medium bei 37°C , 20 % O_2 und 6,5 % CO_2 angezüchtet. Ein Mediumwechsel erfolgte zweimal pro Woche.

HepG2-Zellen sind adhärente Zellen, welche auf dem Boden des Kulturgefäßes inselartige Gruppen von Monolayern bilden. Zum Ablösen der Zellen wurden bei Erreichen einer 80-90 %igen Konfluenz das Kulturmedium verworfen, die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen und schließlich für fünf Minuten in 5 ml einer 0,05 % Trypsin/ EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Trypsinwirkung durch Zugabe von 15ml eines FCS-haltigen Mediums. Die abgelösten Zellen wurden im entsprechenden Kulturmedium aufgenommen und auf mehrere Zellkulturflaschen verteilt.

Eine ca. 80 %ige Konfluenz der Zellen wurde am dritten bzw. vierten Tag nach der Zellpassage erreicht und diente als Ausgangspunkt für die meisten Versuche. Die Zellen wurden maximal bis zur 21. Passage verwendet.

3.2.1.5 Kultivierung humaner, primärer Hepatozyten (NHEPS™)

Nach Auftauen der in Stickstoff eingefrorenen primären Hepatozyten, wurden diese in 20ml des Hepatozyten-Erhaltungs-Mediums resuspendiert, zentrifugiert und gezählt. Daraufhin wurden die Zellen in dem Hepatozyten-Kultur-Medium zusammen mit 2 % FBS auf eine Konzentration von 150000 Zellen/ cm^2 eingestellt und in zuvor mit Kollagen beschichteten MTP für verschiedene Experimente ausgesät.

Für die Kollagenbeschichtung wurden die GIBCO® Kollagenlösung auf $50\mu\text{g}/\text{ml}$ verdünnt und mit 0,02 molarer Essigsäure versetzt. Anschließend wurden $5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ dieser Mixtur in die Plattenvertiefungen gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abnahme der Kollagenlösung aus den Vertiefungen wurden diese zur Entfernung der Säure dreimal mit PBS gewaschen und bis zur Aussaat der Zellen bei $2-8^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37° C, 20 % O₂ und 6,5 % CO₂. Drei Stunden nach Verteilung der Zellen auf die Platten und danach jeden folgenden Tag wurde das Medium durch frisches, angewärmtes Hepatozyten-Kultur-Medium (ohne FBS) ausgetauscht und weiter inkubiert.

Die durchschnittliche Überlebenszeit der primären Hepatozyten betrug unter diesen Bedingungen sieben Tage.

3.2.2 Stimulations-Experimente

3.2.2.1 Stimulationsexperimente mit HepG2 Zellen

Für diese Versuche wurden die HepG2-Zellen in 6- und 12-well MTP ausgesät. Nachdem die Zellen eine Konfluenz von ca. 80 Prozent erreicht hatten, wurde das Medium verworfen und die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen.

Für Real-Time-Analysen wurden die in 12-well MTP ausgesäten Zellen anschließend mit IFN- γ (300 U/ml final in HepG2-Medium diluiert), TNF- α (50ng/ml final in HepG2-Medium diluiert) bzw. 300 μ l des Überstandes von den aus der Leber generierten T-Zellklonen (T_H-1, T_H-2, T_H-17 und T_H-22) stimuliert. Als Negativkontrolle dienten mit HepG2- bzw. mit Kloniermedium inkubierte HepG2-Zellen.

Die unterschiedlich stimulierten Vertiefungen wurden daraufhin jeweils nach 12, 24 und 48 Stunden zweimal mit PBS gewaschen und durch die Zugabe von 100 μ l Trypsin von der Platte abgelöst. Die Zellen wurden daraufhin zur Lyse in 350 μ l RLT-Puffer aufgenommen und bis zur Durchführung der Real-Time-PCR (*vgl. 3.2.3.4 und 3.2.3.5*) bei -80°C eingefroren.

Für die durchflusszytometrische Bestimmung des IL-22-Rezeptors wurden die HepG2-Zellen in einer 6-well MTP, wie oben beschrieben, mit IFN- γ und TNF- α für 24 Stunden stimuliert, zweimal mit PBS gewaschen und durch Zugabe von entweder 100 μ l Trypsin oder 500 μ l Accutase von der Platte abgelöst. Anschließend erfolgte die extrazelluläre Färbung des Rezeptors (*vgl. 3.2.3.1.1*).

3. Material und Methoden

Zur Generierung von konditioniertem Überstand wurden die HepG2-Zellen mit verschiedenen Ethanolkonzentrationen (0,001 %, 0,01 %, 0,1 % und 1 %) bzw. mit Poly I:C (20 bzw. 50µg/ml) für 12 Stunden stimuliert, zur Entfernung des Stimulans mehrfach mit PBS gewaschen und schließlich in frischem HepG2-Medium für weitere 48 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation von aus dem Blut isolierten CD4⁺-Zellen mit diesem generiertem Überstand. Für die Auswertung dieses Versuches wurden abschließend verschiedene Zytokine (IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17, IL-22 und TNF- α) mittels ELISA (vgl. 3.2.3.3) bestimmt. Abbildung 5 zeigt eine Übersicht der beschriebenen Stimulation.

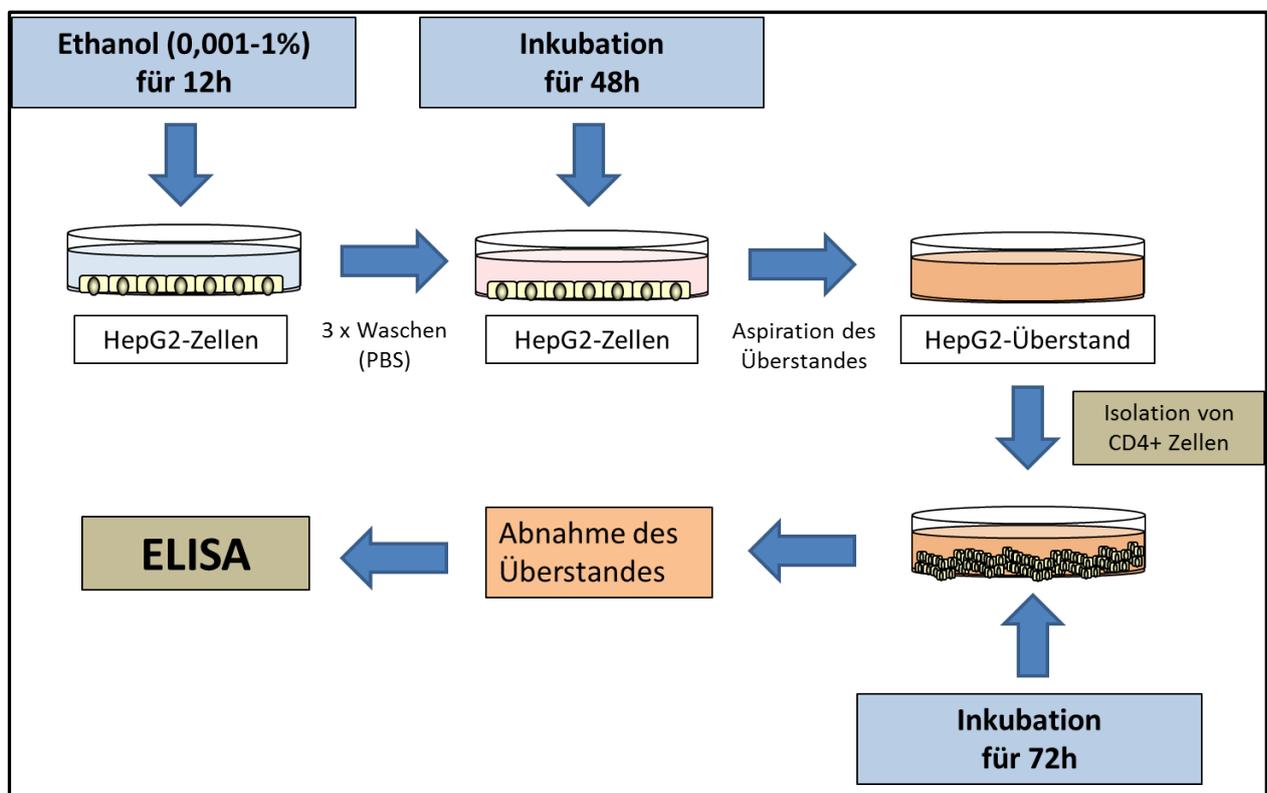


Abbildung 5: Versuchsablauf am Beispiel der Inkubation von CD4⁺-T-Zellen in Gegenwart eines alkoholischen Lebermikromilieus

Zuerst erfolgte zur Generierung von konditioniertem Überstand eine Stimulation der HepG2-Zellen mit Ethanol. Anschließend wurden aus dem Blut isolierte CD4⁺-Zellen mit diesem Überstand stimuliert. Die Auswertung erfolgte schließlich durch Ermittlung der Zytokinproduktion mittels ELISA

3.2.2.2 Stimulationsexperimente mit primären Hepatozyten

Zur durchflusszytometrischen Bestimmung des Oberflächenmoleküls MHC-I wurden primäre Hepatozyten mit einer Konzentration von 165000 Zellen pro Vertiefung in einer mit Kollagen beschichteten 48-well MTP ausgesät. Nach zwei Tagen wurde das Medium verworfen und die Zellen wurden vorsichtig einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Hepatozyten im dreifachen Ansatz für 36 Stunden jeweils in einem 500µl Volumen mit IFN- γ (300U/ml final), IL-22 (50ng/µl final) bzw. IFN- γ + IL-22 stimuliert. Als Negativkontrolle dienten mit *Hepatozyten Kultur Medium* (ohne Hydrocortison) inkubierte primäre Hepatozyten.

Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin von der Platte gelöst und für die FACS-Färbung vorbereitet (vgl. 3.2.3.1.1).

Als weitere Methode zur indirekten Bestimmung der MHC-I-Expression primärer Hepatozyten wurde ein Zytotoxizitäts-Test durchgeführt.

Hierbei wurden vorher ausgesäten und unterschiedlich stimulierten primären Hepatozyten, heterologe zytotoxische T-Zellen zugegeben. Diese CD8⁺-Zellen erkennen die Leberzellen anhand deren MHC-I-Struktur als fremd an und töten diese ab. Da das Ausmaß der Leberzellabtötung von der Dichte der MHC-I-Moleküle auf der Zelloberfläche abhängt, können durch Bestimmung des Toxizitätsgrades indirekt Rückschlüsse auf die Expression des MHC-I-Moleküls gemacht werden. Da es durch die beim Zelltod angerichtete Membranschädigung zu einer raschen Ausschleusung der zytosolischen Laktatdehydrogenase in das Zellkulturmedium kommt, ist die im Überstand mittels ELISA detektierte LDH-Aktivität ein Maß für die toxische Schädigung der Zellen.

Abbildung 6 soll das Prinzip dieses Versuches veranschaulichen:

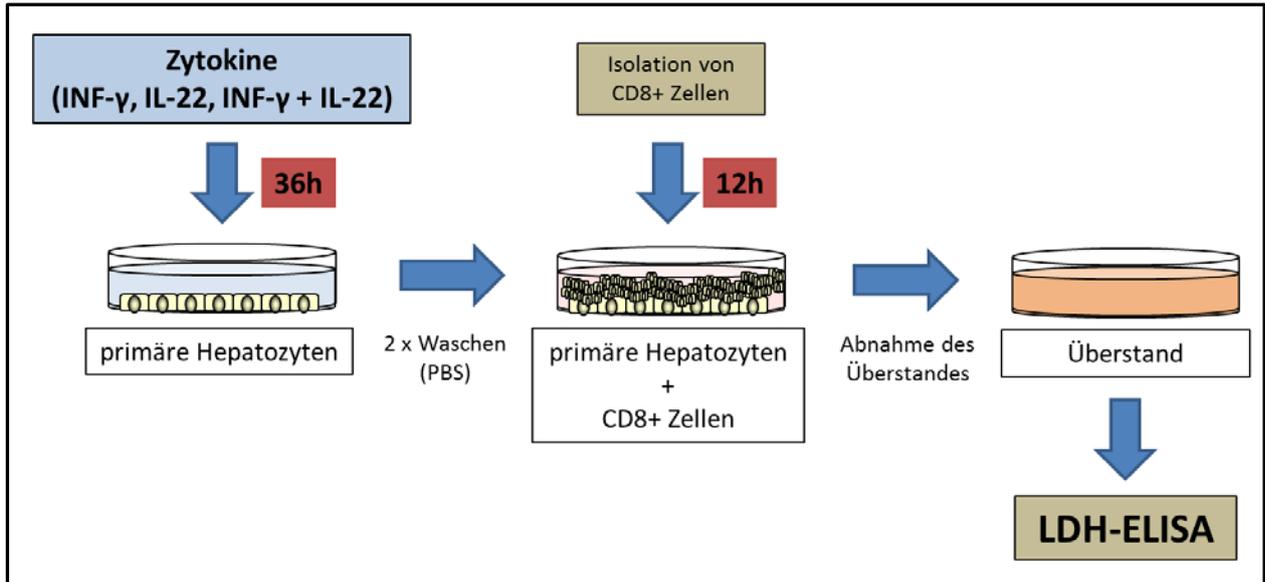


Abbildung 6: Bestimmung der MHC-I Expression mittels Zytotoxizitäts-Test

Nach Stimulierung der primären Hepatozyten mit verschiedenen Zytokinen, wurden diese mit CD8⁺-Zellen inkubiert und abschließend die Toxizität mittels LDH ELISA ermittelt.

Bei diesem Versuch wurden zuallererst primäre Hepatozyten mit einer Konzentration von 75000 Zellen pro Vertiefung in einer mit Kollagen beschichteten 96-well MTP ausgesät. Nachdem die Zellen in etwa zu 70 Prozent konfluent waren, wurde das Medium verworfen und die Zellen wurden vorsichtig zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Hepatozyten im sechsfachen Ansatz für 36 Stunden jeweils mit 200µl IFN-γ (300U/ml final), IL-22 (50ng/µl final) bzw. IFN-γ + IL-22 stimuliert. Als Negativkontrolle (unstimuliert) dienten mit *Hepatozyten Kultur Medium (ohne Hydrocortison)* inkubierte primäre Hepatozyten.

Daraufhin wurden CD8⁺-Zellen aus dem Vollblut isoliert (vgl. 3.2.1.3), auf eine Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml in DPBS w/o Ca²⁺ /Mg²⁺ mit 1 % BSA eingestellt und jeweils 200µl zu den vorstimulierten Leberzellen gegeben.

Nach einer 12-stündigen Inkubationszeit mit den CD8⁺-Zellen wurde die 96-well MTP mit 1200rpm für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend je 100µl des Überstandes zur Bestimmung der LDH-Aktivität (vgl. 3.2.3.2) in eine ELISA-Platte überführt.

3.2.3 Auswerteverfahren

3.2.3.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (Zytometrie = Zellvermessung), auch als FACS (*Fluorescence-activated cell sorter*) bezeichnet, ist ein optisches Messsystem zur schnellen phänotypischen Charakterisierung von Zellpopulationen. Sie ermöglicht einerseits die Charakterisierung einer Zellsuspension hinsichtlich Zellzahl, Zellgröße und Granularität und andererseits unter Verwendung fluoreszenz-gekoppelter Antikörper (Fluorochromen) Aussagen über zell-assoziierte Moleküle. Tabelle 2 führt die in dieser Arbeit verwendeten Fluorochrome auf.

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Fluorochrome zur durchflusszytometrischen Detektion von Markermolekülen

Fluorochrom	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum	Detektionskanal
FITC (Fluoresceinisothiocyanat)	495nm	520nm	FL1
PE (Phycoerythrin)	564nm	575nm	FL2
PI (Propidiumjodid)	488nm	617nm	FL3
APC (Allophycocyanin)	650nm	660nm	FL4

3.2.3.1.1 Extrazelluläre Färbung

Zur Bestimmung des IL-22-Rezeptors wurden die HepG2-Zellen nach Stimulation mit IFN- γ und TNF- α (vgl. 3.2.2.1) zentrifugiert, pro Vertiefung jeweils in 800 μ l FACS-Puffer aufgenommen und für die Färbung in eine rundbodige 96-well MTP überführt, wiederum zentrifugiert und der Überstand verworfen. Da der IL-22-Rezeptor ein sich an der Zelloberfläche befindendes Heterodimer ist, welches aus den beiden Proteinketten IL-22RA und IL-10R β besteht, wurde er mit zwei verschiedenen fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gekennzeichnet. Gefärbt wurde in einem Volumen von 12 μ l, wobei der IL-10R β Antikörper pur und der IL-22RA Antikörper in einer 1:6 Verdünnung verwendet wurden. Nach 30-minütiger Inkubation der HepG2-Zellen mit den Fluorochromen bei 4°C wurden die Zellen in FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert, in 200 μ l FACS-Puffer resuspendiert und für die durchflusszytometrische Analyse in FACS-Röhrchen überführt.

Für die Ermittlung der MHC-I-Expression wurden die in 48-well MTP stimulierten primären Hepatozyten (vgl. 3.2.2.2), wie oben beschrieben, zur Färbung in einer 98-well MTP vorbereitet. Gefärbt wurde in einem Volumen von 10µl, wobei die Fluorochrome jeweils 1:10 in FACS-Puffer verdünnt wurden. Nach 20-minütiger Inkubation der Leberzellen mit den fluoreszenz-markierten Antikörpern bei 4°C wurden die Zellen in FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert, in 150µl FACS-Puffer resuspendiert und für die durchflusszytometrische Analyse in FACS-Röhrchen überführt.

3.2.3.1.2 Intrazelluläre Färbung

Für die Charakterisierung der etablierten Leber T-Zelllinie bzw. der T-Zellklone wurde eine intrazelluläre Färbung verwendet. Dabei wurden mithilfe von fluoreszenz-markierten Antikörpern verschiedene Zytokine in der Zelle markiert und somit das Zytokinprofil der jeweiligen Zellpopulation bestimmt.

Um die jeweiligen Botenstoffe anzufärben, wurden die Zellen vor der Färbung zur Zytokinproduktion angeregt. Dafür wurden die Zellen in einer 24-well MTP in einem Volumen von 1ml mit Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA, 20ng/ml final) und Ionomycin (1µg/ml final) für sechs Stunden stimuliert.

Hierbei handelt es sich im Vergleich zur antiCD3- / antiCD28-Stimulation um eine alternative Aktivierung von T-Zellen unter Umgehung des gesamten TCR-Komplexes. Die Zelle wird dabei über die Aktivierung der Proteinkinase C durch PMA und den durch Ionomycin-induzierten Ca²⁺-Einstrom direkt aktiviert. Im Vergleich zur physiologischen Stimulation kommt es bei dieser Methode zur maximalen Signalverstärkung.

Um den Export der Zytokine aus der Zelle zu unterbinden und damit die Menge von intrazellulärem Zytokin pro Zelle zu erhöhen, wurden die Golgi-Blocker Monensin und nach zwei Stunden auch Brefeldin A hinzugefügt.

Nach der Stimulation wurden die Zellen in eine 96-kämmrige Rundboden MTP überführt und für 30 Minuten in der Cytofix/Cytoperm-Lösung fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer Saponin-Lösung permeabilisiert und in dieser Lösung in einem Volumen von 20µl für weitere 30

Minuten gefärbt. Saponin muss bei allen Färbe- und Waschschritten der intrazellulären Färbung anwesend sein, da die Permeabilisierung der Zellmembran durch Saponin reversibel ist.

Für die Charakterisierung der T-Zelllinie wurden fluoreszenz-markierte Antikörper gegen die Zytokine IL-17, IL-22, IFN- γ und IL-4 verwendet (vgl. *Tabelle 3*).

Tabelle 3: Übersicht der intrazellulären Färbung

Zytokin /Isotype	Fluorochrom	Verdünnung
IL-17	PE	3/20
IL-22	APC	3/20
IL-4	PE	3/20
IFN- γ	FITC	1/20
Isotype IgG1	PE / APC / FITC	1/20

3.2.3.1.3 PI Färbung

Die mit Ethanol stimulierten HepG2-Zellen wurden durchflusszytometrisch hinsichtlich der Zelltoxizitätsrate untersucht. Dazu wurden die Zellen nach Ablösen in FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert und pro Vertiefung in 200 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde den sich in Suspension befindenden Zellen jeweils 10 μ l Propidiumjodid (PI) zugefügt. PI ist ein Fluoreszenzfarbstoff mit einer hohen Bindungsaffinität zur DNA. Da PI ein nicht membranpermeabler Fluoreszenzfarbstoff ist, gelingt eine Kernfärbung mit PI nur bei geschädigter Plasmamembran, wie sie bei nekrotischen Zellen zu finden ist.

Die Anzahl der PI-positiven Zellen wurde durchflusszytometrisch gemessen. Der prozentuale Anteil der HepG2-Zellen mit hoher Intensität der Rotfluoreszenz wurde bestimmt und diese Zellen wurden als nekrotisch eingestuft.

3.2.3.2 Bestimmung der Zellviabilität

3. Material und Methoden

Zur Bestimmung der Zellviabilität und damit der indirekten MHC-I-Expression auf primären Leberzellen wurden diese mit CD8⁺-Zellen inkubiert (vgl. 3.2.2.2). Anschließend wurde der Überstand asserviert und zur Bestimmung der Zelltoxizitätsrate die LDH-Konzentration kolorimetrischen im Überstand bestimmt.

Dazu wurden gemäß des Protokolls des Herstellers 100µl Zellüberstand mit 100µl Reaktionslösung für 35 Minuten bei Raumtemperatur miteinander versetzt. Das in der Probe vorliegende LDH katalysiert hierbei die Oxidation von Laktat zu Pyruvat, mit der gleichzeitigen Reduktion von NAD⁺ zu NADH/H⁺. Durch eine zweite Enzymreaktion, bei der das Enzym Diaphorase die NADH/H⁺-abhängige Reduktion von einem farblosen Tetrazoliumsals zu einem roten Formazansalz katalysiert, welches photometrisch detektiert werden kann, lässt sich die Aktivität der LDH nachweisen. Die Menge des gebildeten Formazans ist direkt proportional zur LDH-Aktivität und korreliert folglich mit der Anzahl toter Zellen.

Zur Berechnung der Zytotoxizitätsrate wurde für die 12-stündige Inkubation der Hepatozyten mit den CD8⁺-Zellen folgender Ansatz gewählt (vgl. Abb. 7):

	Unstimuliert	INF-γ	IL-22	INF-γ + IL-22
Probe 1				
Probe 2				
Probe 3				
Low Control 1				
Low Control 2				
High Control				

Probe 1-3: 200µl CD8⁺ Zellen (5 x 10⁵ Zellen/ml)
Low Control 1-2: 200µl 1% BSA in DPBS w/o Ca²⁺ /Mg²⁺
High Control: 100µl 1%BSA in DPBS w/o Ca²⁺ /Mg²⁺ + 100µl Triton X Solution (2%)

Abbildung 7: Stimulationsansatz

Als Kontrollen dienten zum einen die sog. *HighControl* und sog. *LowControl*. Erstere ermittelt durch die Lysierung der Hepatozyten mit 2 % Triton X-100 die maximale LDH-Ausschüttung (100 %). Letztere bestimmt die minimale Ausschüttung von LDH (basale Freisetzung), die durch den normalen Zellumsatz der Leberzellen entsteht.

Aus den photometrisch gemessenen Werten konnte mit Hilfe der vom Hersteller mitgelieferten Formel die Zytotoxizität in Prozent berechnet werden:

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = \frac{(\text{Mittelwert der Proben 1-3}) - (\text{Mittelwert der LowControl 1-2})}{(\text{Wert der HighControl}) - (\text{Mittelwert der LowControl 1-2})}$$

3.2.3.3 Enzyme linked immunosorbent Assay (ELISA)

Der Enzymimmunoassay ist eine quantitative analytische Methode, die auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Die in dieser Arbeit verwendeten ELISAs beruhen auf der sogenannten "Sandwich-Technik".

Bei dieser Methode wird zuerst eine ELISA-Platte (Maxi Sorp) mit einem Antikörper beschichtet, der gegen das gesuchte Antigen gerichtet ist. Dazu werden die Platten am Vorabend des Versuches mit einem monoklonalen Primärantikörper über Nacht bei 6-8°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag werden dann die Stellen, an denen kein Antikörper gebunden hat, mit BSA geblockt und anschließend Standards des zu bestimmenden Antigens in verschiedenen Konzentrationen sowie die zu untersuchenden Proben für zwei Stunden zugegeben.

Der Nachweis der Zytokin-Antikörper-Bindung erfolgt durch die Zugabe eines Zweitantikörpers, der unter Bildung des "Sandwiches" von oben an das Antigen bindet. Dieser Zweitantikörper ist biotinyliert und wird im nächsten Inkubationsschritt von einem Konjugat aus Streptavidin und Horseradish Peroxidase (Streptavidin-HRP) erkannt.

Die Detektion erfolgt photometrisch durch Zugabe eines chromogenen Substrats, welches von der HRP enzymatisch umgesetzt wird. Abschließend wird die enzymatische Reaktion mittels H₂SO₄ abgestoppt und die Platte in einem Spektrophotometer gemessen. Je höher der photometrische Wert, desto größer ist die Antigenkonzentration in der Probe. Mit Hilfe der bekannten Standardkonzentration kann der exakte quantitative Wert ermittelt werden.

Alle in dieser Arbeit angewandten ELISAs erfolgten nach den Protokollangaben des Herstellers.

3.2.3.4 Isolierung von mRNA und Generierung von cDNA

Die Aufreinigung der RNA erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit[®] von Qiagen. Die Methode beruht auf der spezifischen Bindungsfähigkeit von RNA an einer Silicamembran und der Microspintertechnologie. Nach der Bindung der RNA an die Membran wird diese mit spezifischen Puffern gewaschen und durch einen Elutionspuffer von der Membran gelöst. Die Isolierung wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Anschließend erfolgte eine photometrische Bestimmung der RNA-Konzentrationen mit Hilfe des NanoDrop. Die Absorption wurde bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm gemessen.

Abschließend wurde die RNA bei -80°C gelagert

Um die isolierte, aufgereinigte und quantitativ vermessene RNA in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben, wurde eine Reverse-Transkription durchgeführt. Bei dieser Methode schreibt eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, auch Reverse-Transkriptase genannt, die RNA in cDNA um. Als Primer wurde ein Oligo-d(T)-Primer verwendet, welcher komplementär zum Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA ist.

Es wurden jeweils 1µg RNA in einem Volumen von 10µl pro Reaktion eingesetzt. Die einzusetzenden Mengen wurden mit Hilfe der gemessenen RNA-Konzentrationen ermittelt und in nukleasefreiem Wasser verdünnt. Das Probenvolumen wurde in eine nukleasefreie Eppendorfampulle pipettiert. Anschließend wurden 10µl eines vorher hergestellten Mastermix hinzugegeben:

Tabelle 4: Mastermix für Reverse Transkription

Substanzen	Volumen pro Reaktion
RT Puffer	2µl
dNTPs (dATP, dGTP, dCTP und dTTP)	0,8µl
Oligo-d(T) Primer	2µl
MultiScribe Reverse Transkriptase	1µl

Nuklease freies Wasser | 4,2µl

Dieser Ansatz wurde im Thermocycler zuerst für 10 Minuten bei 25°C inkubiert, dann für 120 Minuten auf 37°C erwärmt und anschließend für 5 Sekunden auf 85°C erhitzt. Abschließend wurde das Reaktionsgemisch auf 4°C abgekühlt.

Die erhaltene cDNA wurde bei -20°C bis zur Anwendung der quantitativen PCR gelagert.

3.2.3.5 Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR, auch als quantitative Echtzeit-PCR bezeichnet, basiert auf dem gleichen Prinzip wie die klassische Polymerasekettenreaktion, mit der DNA *in vitro* enzymatisch vervielfältigt wird. Jedoch kann bei dieser Methode die DNA zusätzlich quantifiziert werden.

Wie bei der klassischen PCR dienen als Ausgangspunkte der Kettenreaktion kurze Oligonukleotide sog. Primer, deren Basensequenzen zu spezifisch ausgewählten Abschnitten der Ursprungs-DNA (DNA-Matritze) komplementär sind. Nach einer Denaturierung der DNA-Doppelstränge (dsDNA) werden diese beim sog. Annealing bei einer für die jeweilige Primer-Sequenz optimierten Temperatur an die Einzelstränge der DNA-Matritze gebunden. In einer folgenden Elongationsphase wird die DNA mithilfe einer thermostabilen Taq-DNA-Polymerase polymerisiert. Diese drei Phasen (Denaturierung, Annealing und Elongation) bilden einen Zyklus. Erfolgt bei der klassischen PCR die Visualisierung der amplifizierten DNA-Sequenz in der Regel über eine gelelektrophoretische Auftrennung und Anfärbung des PCR-Produktes, bedient sich die Real-Time-PCR einer photometrischen Fluoreszenzbestimmung der DNA-Amplifikate während der laufenden PCR (real time).

Die bei dieser Arbeit angewandte Methode basiert auf dem sog. SYBR Green I Farbstoff. Dieser im gebundenen Zustand photometrisch detektierte Fluoreszenzfarbstoff bindet ausschließlich an doppelsträngige DNA. Folglich kann das PCR-Produkt von Zyklus zu Zyklus verfolgt werden.

Zur Quantifizierung der untersuchten DNA-Sequenz wird der in der exponentiellen Amplifikationsphase gemessene CT-Wert bestimmt. Dieser Wert beschreibt den Amplifikationszyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-

3. Material und Methoden

Fluoreszenz ansteigt. Je mehr DNA zu Beginn der Reaktion vorhanden ist, desto niedriger ist der zu erwartende CT-Wert.

Für alle getesteten Gene wurde folgender Reaktionsansatz gewählt:

Tabelle 5: Reaktionsansatz pro Probe

I. Primer / SYBR Green Mix: 9,75µl	II. cDNA: (5ng/µl) 5,25µl
Primer Master Mix (PMM)*: 2,35µl	
SYBR Green Mix: 7,35µl	

*PMM: 10µl Forward Primer (100µM), 10µl Reverse Primer (100µM), 230µl Nuklease freies Wasser

Das Expressionsverhalten folgender Zielgene wurde untersucht:

GAPDH, 18S, IL22RA, IL10Rβ, TNF-α, IL-6, IL-7, IL-15, CXCL-9, CXCL-10, C1R, CFB, TLR3, TLR6.

Nach Vorbereitung der verschiedenen Mixturen wurden zu 5,25µl der jeweiligen cDNA-Probe, 9,75µl des Primer / SYBR Green Mixes in eine 384-well Real-Time-MTP pipettiert. Pro Probe wurde jeweils ein dreifacher Ansatz gewählt, um mögliche Pipettierfehler auszugleichen. Anschließend wurde die Platte versiegelt, zentrifugiert und im Real-Time-PCR-Gerät gemessen.

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Tabelle 6: Protokoll der Polymerase-Kettenreaktion

I.	Denaturierung	95°C	6 min
II.	Amplifikation (45 Zyklen)		
	II. Denaturierung	95°C	15 s
	III. Annealing der Primer	60°C	8 s
	IV. Synthese durch Taq-Polymerase	72°C	20 s
III.	Schmelzung der Produkte	95°C	0 s
		60°C	15 s
		95°C	0 s
IV.	Kühlung	40°C	30s

		RT	
--	--	----	--

Um das spezifische Expressionsverhalten der Zielgene zu bestimmen, wurde die Zykluszahl ermittelt, bei der das für die entsprechende Probe entstandene Fluoreszenzsignal erstmals exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt. Dies entspricht dem sog. CT-Wert. Anschließend wurde von dem CT-Wert eines bestimmten Zielgens, z.B. CXCL9, der CT-Wert eines „Housekeeping-Genes“ subtrahiert und so der sog. Δ CT-Wert gebildet. „Housekeeping-Gene“ sind Gene, deren Expressionsverhalten sich bei unterschiedlichen experimentellen Bedingungen nicht unterscheiden dürfen, also nicht-regulierte Gene. Folglich muss in stimulierten und unstimulierten Zellen die gleiche Menge mRNA der „Housekeeping-Gene“ enthalten sein. Typischerweise handelt es sich bei diesen Genen um Strukturmoleküle oder Enzyme des Zellgrundstoffwechsels.

In der vorliegenden Arbeit wurden Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) sowie 18S als „Housekeeping-Gene“ verwendet.

Zur Ermittlung der Expression eines Zielgens nach Stimulation in Bezug zur Negativkontrolle wurde der sog. $\Delta\Delta$ CT-Wert gebildet. Diesen erhält man durch Subtraktion des Δ CT-Wertes eines Zielgens der Negativkontrolle von einem Δ CT-Wert eines Zielgens nach Stimulation. Schließlich kommt folgende Formel zum Einsatz:

$$\text{relative Expression} = 2^{\Delta\Delta\text{CT}}$$

3.3 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden die Programme Microsoft Excel (Microsoft, Seattle, USA) und GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA) angewendet. Der ungepaarte t-Test kam zum Einsatz, wobei ab einen p-Wert von $p < 0,05$ Unterschiede zwischen verschiedenen Stichproben als signifikant eingeschätzt wurden. p-Werte von $< 0,05$ wurden mit (*), p-Werte $< 0,01$ mit ** und p-Werte $< 0,001$ mit *** gekennzeichnet.

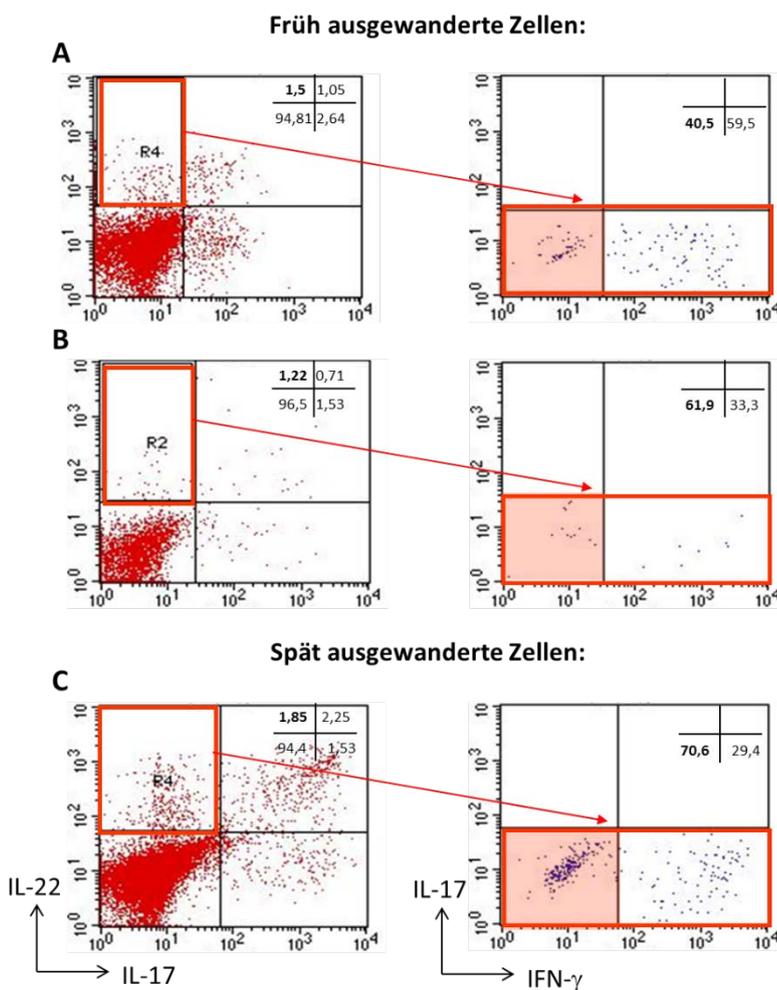
4. Ergebnisse

4.1 Generierung spezifischer T-Zellklone aus einer Leberprobe

4.1.1 Charakterisierung der etablierten Leber T-Zelllinie

Die aus der Leberprobe etablierte T-Zelllinie wurde zur Charakterisierung auf die Zytokine IL-17, IL-22 und IFN- γ intrazellulär gefärbt. Dabei wurden zwei T-Zellpopulationen unterschieden. Die sog. „früh ausgewanderten Zellen“ stellten T-Zellen dar, welche bereits nach 9 Tagen aus der Leberprobe migriert waren. Diese Population wurde 12 Tage (vgl. Abb. 8, A) bzw. 20 Tage (vgl. Abb. 8, B) nach Ansetzen der T-Zelllinie gefärbt. Die „spät ausgewanderten Zellen“ hingegen wurden erst nach weiteren 11 Tagen von der Leberprobe eingesammelt.

Abbildung 8 zeigt die Dot Plots der intrazellulären Färbung. In der linken Spalte werden die Zellen



hinsichtlich der Zytokine IL-17 und IL-22 gegenüber gestellt. Mithilfe des Gates R4 in der linken Spalte wurden nur IL-22 positive, jedoch IL-17 negative Zellen in der rechten Spalte hinsichtlich ihres IFN- γ -Profils untersucht.

Abbildung 8: Charakterisierung der etablierten T-Zelllinie

Unterschieden wird zwischen „früh ausgewanderten Zellen“ (A) und (B) und „spät ausgewanderten Zellen“ (C).

Bei den „früh ausgewanderten Zellen“ wurde 12 Tage (A) bzw. 20 Tage (B), bei den „spät ausgewanderten Zellen“ 20 Tage (C) nach Ansetzen der T-Zelllinie gefärbt.

Die linke Spalte stellt die Gegenüberstellung von IL-17 und IL-22 dar. Mithilfe des Gates R4 werden in der rechten Spalte daraufhin die IL-22 positiven Zellen hinsichtlich ihres IFN- γ -Profils untersucht. Das rosa hinterlegte Quadrat stellt IL-22 positive und IL-17/IFN- γ negative Zellen dar.

Die intrazelluläre Färbung der T-Zelllinie zeigte nur einen geringen Anteil an IL-22- und IL-17-positiven Zellen. Den höchsten Anteil erzielte die „spät ausgewanderte Zell“-Fraktion mit 3,78 % IL-17- bzw. 4,1 % IL-22-positiven T-Zellen (vgl. Abb. 8, C).

Da es sich bei T_H-22-Zellen um IL-22-positive, jedoch IL-17- und IFN- γ -negative T-Zellen handelt, konnte mit dieser Färbung die Anzahl dieses T-Helferzell-Subtyps in der etablierten T-Zelllinie bestimmt werden. Bei den „früh ausgewanderten Zellen“ betrug der Anteil der T_H-22-Population 0,61 % (vgl. Abb. 8, A) 12 Tage bzw. 0,75 % (vgl. Abb. 8, B) 20 Tage nach Ansetzen der T-Zelllinie. Die „spät ausgewanderten Zellen“ hatten mit 1,41 % (vgl. Abb. 8, C) einen doppelt so hohen Anteil an T_H-22-Zellen. Daher wurde auch diese Population für die spätere Klonierung verwendet.

Um den Anteil der T_H-22-Zellen für die Klonierung der T-Zellpopulation zu erhöhen, wurde ein sog. IL-17-Secretion-Assay durchgeführt. Diese Methode führte zu Abtrennung von IL-17-positiven Zellen von der restlichen Population und sollte dementsprechend den T_H-22-Zellanteil erhöhen.

In Abbildung 9 sind die Ergebnisse dieser Methode dargestellt. Da der IL-17-Detektionsantikörper PE-gekoppelt war, konnte nach der magnetischen Auftrennung der T-Zellen in eine IL-17-positive und eine IL-17-negative Fraktion eine durchflusszytometrische Auswertung erfolgen. Es wurde davon ausgegangen, dass die mit dem IL-17-Detektionskörper markierten Zellen, IL-17-produzierende Zellen darstellten. Andererseits wurden die T-Zellen, die nicht mit dem PE-fluoreszierenden Antikörper markiert waren, als IL-17-negative Zellen definiert.

Die IL-17-negativ-Fraktion (vgl. Abb. 9, C) zeigte einen deutlich geringeren Anteil an IL-17-positiven Zellen (6,56 %) im Vergleich zu der IL-17-positiv-Fraktion (68,5 %) (vgl. Abb. 9, B).

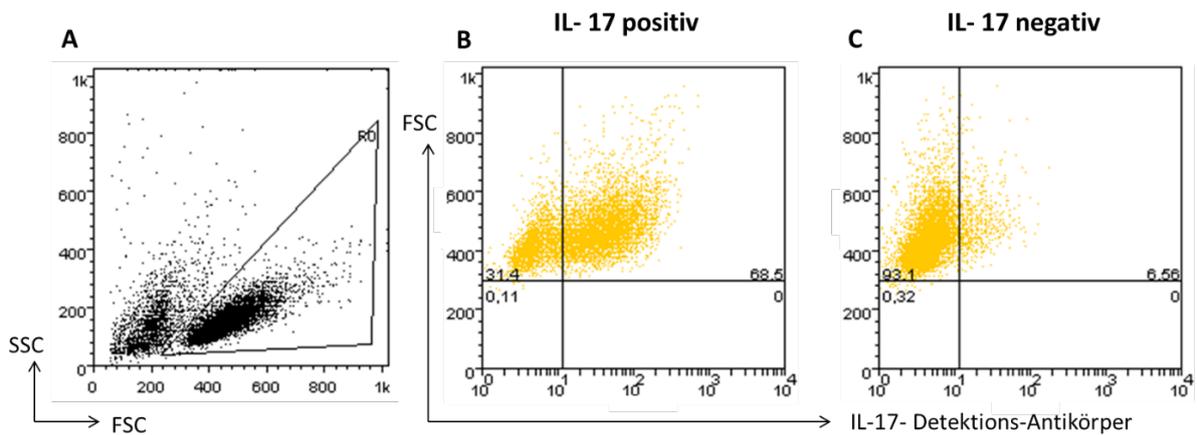


Abbildung 9: IL17-Secretion-Assay Auswertung

In (A) ist der sog. „forward/sideward scatter“ gezeigt, über den die Zellen anhand ihrer Größe und Granularität bestimmt werden können. T-Zellen liegen im gate R0. (B) Durchflusszytometrische Bestimmung des PE-gekoppelten IL-17-Detektionsantikörper nach magnetischer Auftrennung der T-Zellpopulation in IL-17-positive (B) und IL-17-negative (C) Zellen.

4.1.2 Charakterisierung der T-Zellklone

Im Rahmen dieser Arbeit konnten 37 verschiedene Klone aus zwei verschiedenen Leberproben isoliert werden. Es wurden dazu vier verschiedene Klonierungen angesetzt. Eine zweimalige Klonierung der IL-17-negativen T-Zellfraktion des IL-17-Secretion-Assays erbrachte keinen einzigen T-Zellklon. Deshalb wurden für die Generierung der T-Zellklone direkt die „spät ausgewanderten Zellen“ verwendet, da diese einen höheren Anteil an T_H -22-Zellen aufwiesen.

Um die erhaltenen T-Zellklone zu charakterisieren, wurde deren Zytokinprofil mittels ELISA und Durchflusszytometrie bestimmt.

4.1.2.1 Bestimmung des Klon-Zytokinprofils mittels ELISA

Zur Charakterisierung der einzelnen T-Zellklone wurde mit Hilfe von ELISA ein Zytokinprofil der jeweiligen Klone erstellt. Dazu wurde der Überstand der spezifischen T-Zellklone 48 Stunden nach Restimulation mit antiCD3/antiCD28 auf den Gehalt der Zytokine IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17, IL-22 und TNF- α hin untersucht.

Die Verteilung der genannten Zytokine ergab deutliche Unterschiede unter den Klonen, die Rückschlüsse auf den Zelltyp zuließen. Die Zuordnung der einzelnen Klone zu den jeweiligen T-

4. Ergebnisse

Helferzelltypen T_H-0, T_H-1, T_H-2, T_H-17 und T_H-22 erfolgte nach dem in Tabelle 7 dargestellten Schema.

Aufgrund von Überschneidungen zwischen den einzelnen Subtypen stellt dies jedoch nur eine theoretische Übersicht dar.

Tabelle 7: Theoretisches Zytokinprofil der einzelnen T-Zell-Subtypen

Zuordnung der verschiedenen T-Zell-Subtypen anhand ihres Zytokinprofils. Dabei steht + für einen geringen, ++ für einen mäßigen und +++ für einen hohen Zytokingehalt im ELISA. (+) zeigt an, dass der jeweilige T-Helferzelltyp das Zytokin produzieren kann, jedoch nicht zwangsweise muss. Eine schwarz hinterlegte Fläche bedeutet, dass dieses Zytokin nicht von dem jeweiligen Klon produziert wird.

Klon/ Zytokinprofil	T _H -0	T _H -1	T _H -2	T _H -17	T _H -22
IFN- γ	+	+++			
IL-4	+		+++		
IL-10	(+)		+		
IL-17	(+)	(+)	(+)	+++	
IL-22	(+)	(+)		++	+++
TNF- α	(+)	+			+

Von den 37 aus der Leber T-Zelllinie erhaltenen Klonen ergab sich folgende Verteilung der verschiedenen T-Helferzelltypen (vgl. Abb. 10):

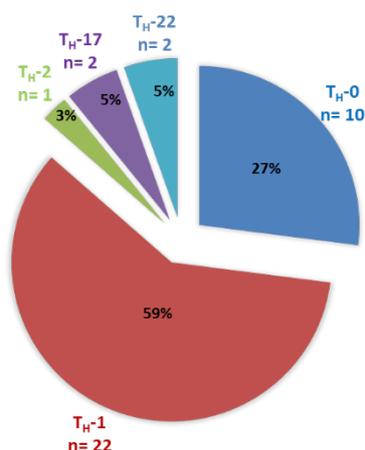


Abbildung 10: Verteilung der T-Zellklone

Dargestellt ist die Aufteilung der aus der Leber T-Zelllinie gewonnenen T-Zellklone in die verschiedenen T-Helferzelltypen (T_H-0, T_H-1, T_H-2, T_H-17, T_H-22).

Mit insgesamt 22 Klonen war der T_H-1-Typ, der damit über die Hälfte der aus der hepatischen T-Zelllinie gewonnenen Klone darstellte, am häufigsten vertreten. An zweiter Stelle stand der T_H-0-Typ, der mit 10 Klonen ein Viertel aller gewonnenen T-Zellklone ausmachte. Mit jeweils zwei Klonen waren der T_H-17- und der T_H-22-Typ am dritthäufigsten vertreten. Die am wenigsten häufig isolierte T-Helferzellklasse stellte mit nur einem Klon der T_H-2-Typ dar.

In Abbildung 11 ist das Zytokinprofil je eines Vertreters der verschiedenen T-Helferzell-Subpopulationen dargestellt. Das Profil der anderen Klone ist im Anhang zu finden.

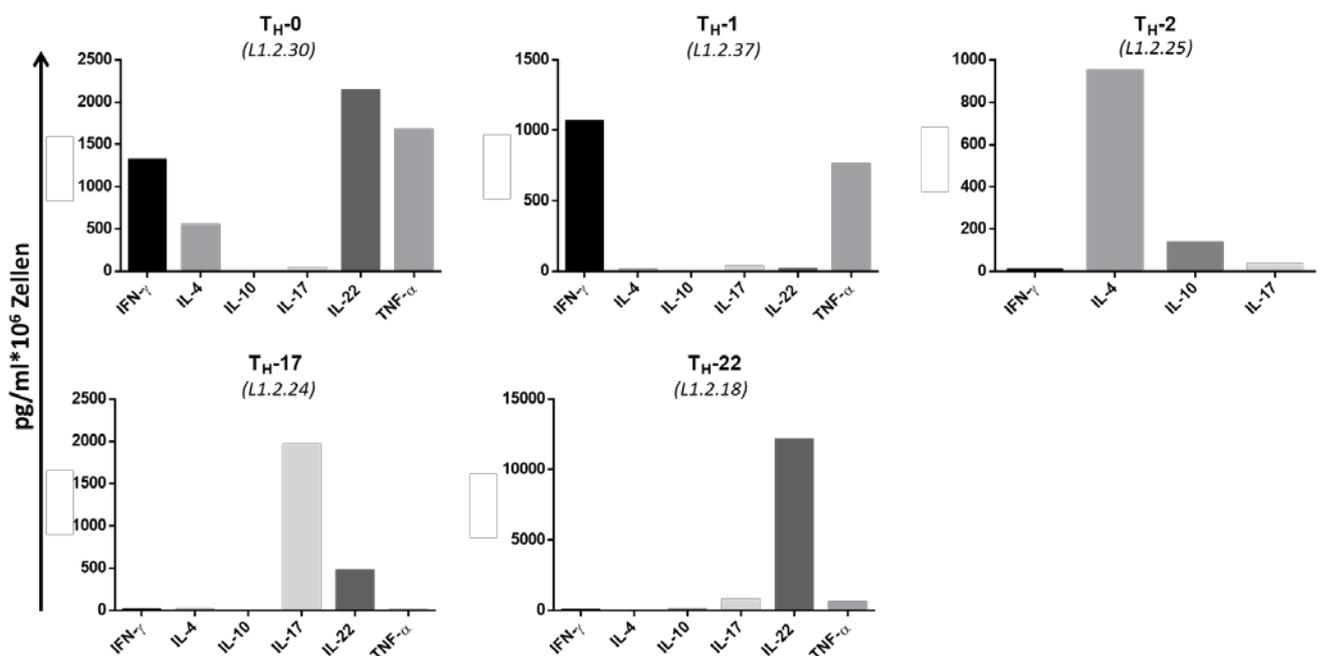


Abbildung 11: Zytokinprofil je eines Vertreters der verschiedenen T-Helferzell-Subpopulationen

Dargestellt ist das Zytokinprofil je eines Vertreters der mittels ELISA charakterisierten T-Helferzellklone (T_H-0, T_H-1, T_H-2, T_H-17, T_H-22). In Klammern ist die jeweilige Bezeichnung des Klons aufgeführt. Die restlichen Klone sind im Anhang aufgeführt.

Betrachtet man die Zytokinverteilung unter allen T-Zellklonen (vgl. Abb. 12) zeigte sich, dass 86 % aller Klone IFN- γ bzw. 78 % TNF- α sezernierten, was primär an der hohen Anzahl von T_H-0- und T_H-1-Klonen lag.

Obwohl nur zwei Klone des T_H-22-Typs isoliert wurden, betrug der Anteil der IL-22-produzierenden Klone 35 %. Dies lag vor allem daran, dass neben den beiden T_H-17-Klonen sechs der T_H-0- (vgl. Abb.11 T_H-0-Vertreter) und drei der T_H-1-Klone ebenfalls IL-22 sezernierten. Der

Anteil der T_H-2-typischen Zytokine IL-4 und IL-10 betrug trotz nur eines T_H-2-Klons 29 % bzw. 27 %, was vor allem an den T_H-0-Klonen lag. Das Zytokin IL-17 wurde nur in den beiden T_H-17-Zellen sowie einem der T_H-22-Klone aufgefunden und hatte somit mit 8 % den geringsten Anteil.

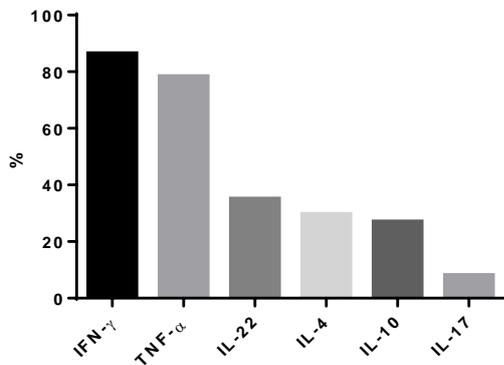


Abbildung 12: Zytokinverteilung unter den Klonen

Prozentuale Verteilung der im ELISA bestimmten Zytokine (IFN- γ , TNF- α , IL22, IL4, IL-10, IL-17) unter allen aus der hepatischen T-Zelllinie isolierten Klonen. Dargestellt wird der Anteil an Klonen, die das jeweilige Zytokin im ELISA sezerniert haben.

4.1.2.2 Bestimmung des Klon-Zytokinprofils mittels Durchflusszytometrie

Neben der immunochemischen Bestimmung des Zytokinprofils wurden einige Klone auch durchflusszytometrisch charakterisiert. Dazu wurden nach Stimulation der Klone die sich intrazellulär befindenden Zytokine, IFN- γ , IL-4, IL-17 und IL-22, mit fluoreszenz-markierten Antikörpern angefärbt.

Auszugsweise wird in Abb. 13 die intrazelluläre Färbung eines T_H-1-Klons (*L1.2.26*) gezeigt. Es zeigte sich, wie aus den ELISA Ergebnissen zu erwarten war, eine IFN- γ -positive und IL-4-negative Zellpopulation (*vgl. Abb. 13, A*). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass der Klon das Zytokin IL-22 produzierte (*vgl. Abb. 13, B*). Obwohl in der immunochemischen Charakterisierung dieses Klons keine IL-17-Aktivität festgestellt werden konnte, zeigte die durchflusszytometrische Auswertung eine IL-17-positive Population (*vgl. Abb. 13, C*).

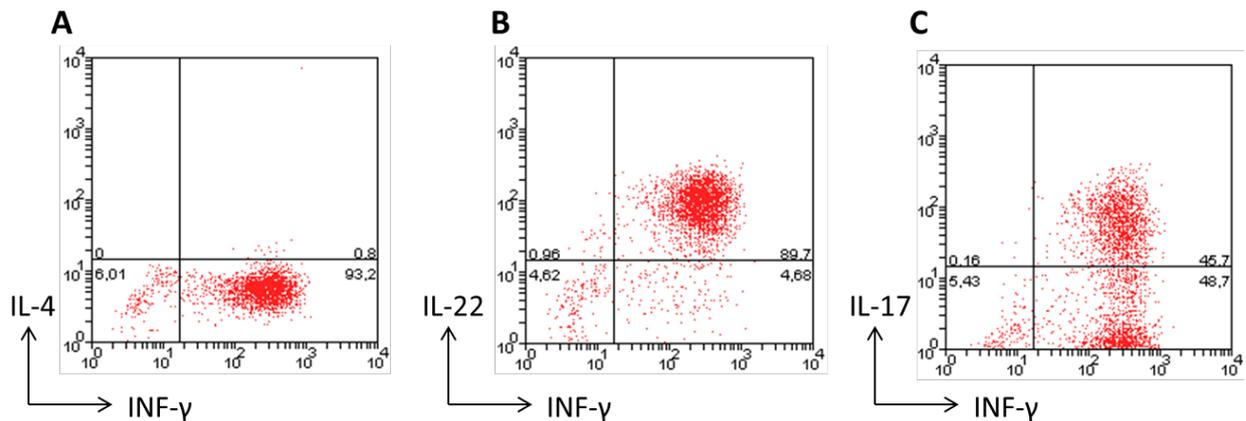


Abbildung 13: Durchflusszytometrische Charakterisierung eines T-Zellklons

Durchflusszytometrische Bestimmung der Zytokine IL-4, IL-17, IL-22 und IFN- γ (intrazelluläre Färbung) in einem von der hepatischen T-Zelllinie isolierten T-Zellklon. (A) zeigt die Gegenüberstellung von IL-4 und IFN- γ , (B) von IL-22 und IFN- γ und (C) von IL-17 und IFN- γ .

4.2 Effekt von T-Zellen auf HepG2-Zellen

4.2.1 Bestimmung des IL-22-Rezeptors auf HepG2-Zellen

Um die Wirkung von T_H-22-Zellen auf HepG2-Zellen zu ergründen, wurde zuerst untersucht, ob diese Zellen den IL-22-Rezeptor exprimieren und ob sich die Expression durch Stimulation mit IFN- γ bzw. TNF- α verändern kann. Die Bestimmung des Rezeptors erfolgte dabei durch eine extrazelluläre Färbung mit Hilfe des Durchflusszytometers.

Der IL-22-Rezeptor ist ein Dimer und besteht aus den beiden Proteinketten IL-22 RA und IL-10 R β . Die adhärenenten HepG2-Zellen wurden vor der Färbung mit Trypsin bzw. mit Accutase von der MTP gelöst, um einen möglichen Verdau des IL-22-Rezeptors durch das Enzym Trypsin auszuschließen.

Die Dot Plots in Abb. 14 C-E zeigen das Expressionsverhalten des IL-22-Rezeptors unter den verschiedenen Stimulationsbedingungen, negativ-Kontrolle (nicht stimuliert) und 24-stündiger Stimulation mit IFN- γ (300 U/ml) bzw. TNF- α (50 ng/ml). Während in der oberen Zeile die Ablösung der Zellen mit Trypsin erfolgte, wurde in der unteren Accutase verwendet. In Abb. 15

4. Ergebnisse

ist das Expressionsverhalten der beiden Proteinketten des IL-22-Rezeptors im Histogramm dargestellt.

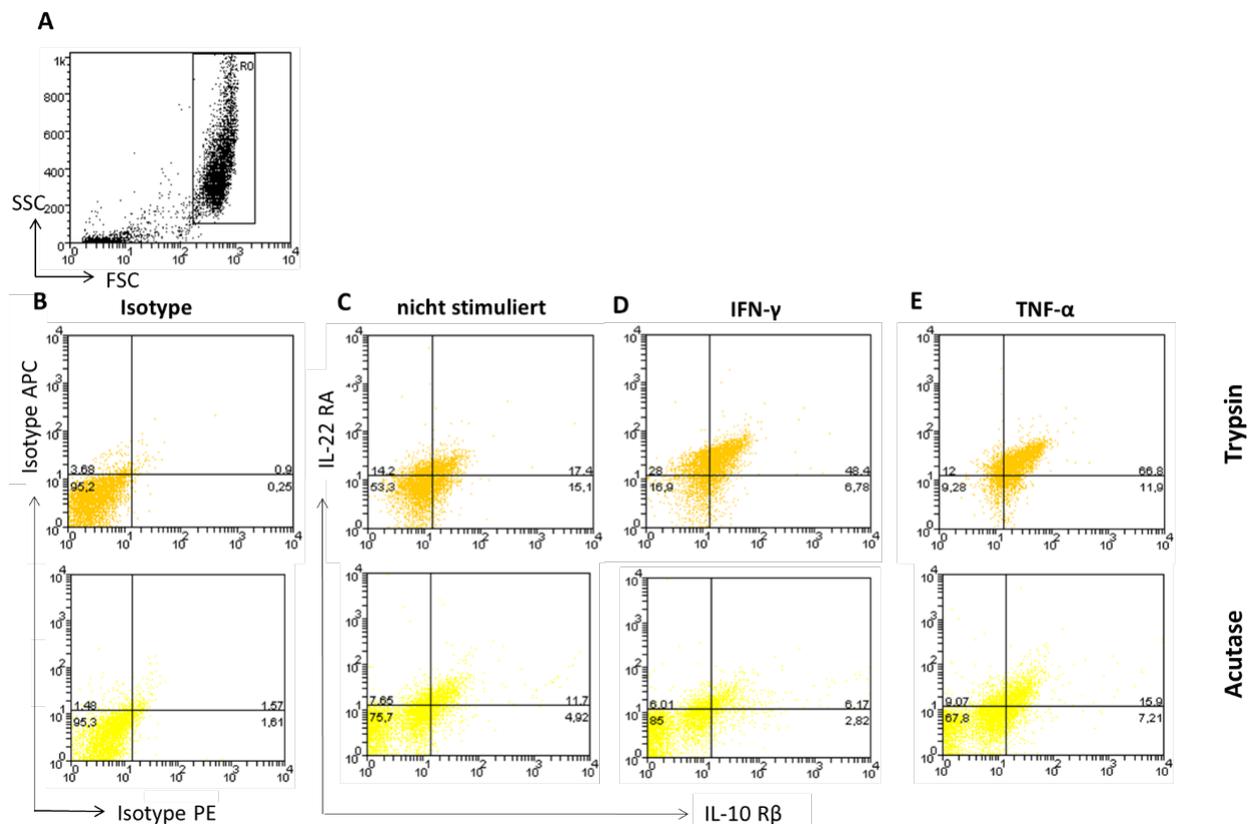


Abbildung 14: Expressionsverhalten des IL-22-Rezeptors auf HepG2-Zellen

Durchflusszytometrische Bestimmung des IL-22-Rezeptors auf HepG2-Zellen. Der IL-22-Rezeptor ist ein Dimer, bestehend aus den Proteinketten IL-22 RA und IL-10 Rβ. In (A) ist der „forward/sideward scatter“ gezeigt. Mithilfe des Gates R0 werden in (B-E) nur die aktiven HepG2-Zellen betrachtet. Dabei erfolgte in der oberen Zeile einer Ablösung der adhärennten HepG2-Zellen mit Trypsin, während in der unteren Zeile Accutase verwendet wurde. (B) zeigt die Isotyp-Kontrollfärbung und (C-E) die Rezeptorexpression unter verschiedenen Bedingungen: (C) negativ-Kontrolle, (D) IFN- γ -Stimulation (300 U/ml), (E) TNF- α -Stimulation (50 ng/ml) (jeweils 24h).

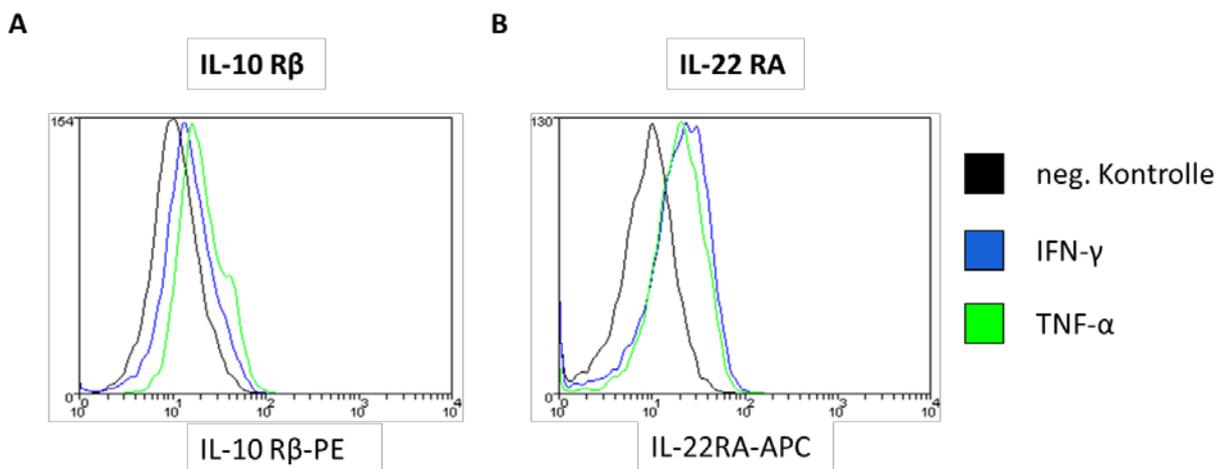


Abbildung 15: Histogramm - Expressionsverhalten der beiden Untereinheiten des IL-22-Rezeptors

Darstellung der beiden Proteinketten des IL-22-Rezeptors, IL-10 R β (A) und IL-22 RA (B) mittels Fluoreszenzintensitäten im Histogramm unter unterschiedlichen Stimulationsbedingungen der HepG2-Zellen (Ablösung mit Trypsin): negativ-Kontrolle (schwarz), IFN- γ (300 U/ml) (blau), TNF- α (50 ng/ml) (grün) für jeweils 24h.

Im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle (vgl. Abb. 14, B) zeigte sich eine vorhandene Expression des IL-22-Rezeptors auf den HepG2-Zellen, sowohl mit Trypsin als auch mit Accutase, unter allen Stimulationsbedingungen (vgl. Abb. 14, C-E). Dabei konnte eine zunehmende Dichte des Rezeptors unter Stimulation mit IFN- γ und am stärksten mit TNF- α beobachtet werden (vgl. Abb. 14 und 15).

Ein Vergleich der verschiedenen Ablösetechniken zeigte keine Verdauung des Rezeptors durch das Enzym Trypsin.

Für alle folgenden Versuche wurde daher beim Ablösen der Zellen Trypsin verwendet.

4.2.2 Effekt spezifischer T-Zell-Subtypen auf HepG2-Zellen

Um den bestmöglichen Zeitpunkt für eine quantitative PCR bei HepG2-Zellen zu ergründen, wurden diese in einem ersten Versuch für jeweils 12, 24 und 48 Stunden mit IFN- γ (300 U/ml) bzw. TNF- α (50 ng/ml) stimuliert und daraufhin eine Real-Time-PCR der cDNA durchgeführt. Bei diesem Versuch wurden zwei „Housekeeping-Gene“ verwendet, 18S und GAPDH. Es stellte

4. Ergebnisse

sich heraus, dass 18S das konstantere Gen ist, weshalb dieses auch in den folgenden Versuchen alleinig verwendet wurde.

Abbildung 16 zeigt die relative Expression verschiedener Gene bezogen auf das jeweilige Gen der negativ-Kontrolle nach 12-, 24- und 44-stündiger Stimulation mit IFN- γ bzw. TNF- α . Als Gene wurden zum einen der IL-22-Rezeptor mit seinen beiden Untereinheiten gewählt sowie die Botenstoffe IL-6, TNF- α und CXCL9, deren Regulation durch IFN- γ und TNF- α bereits beschrieben wurde [138-141].

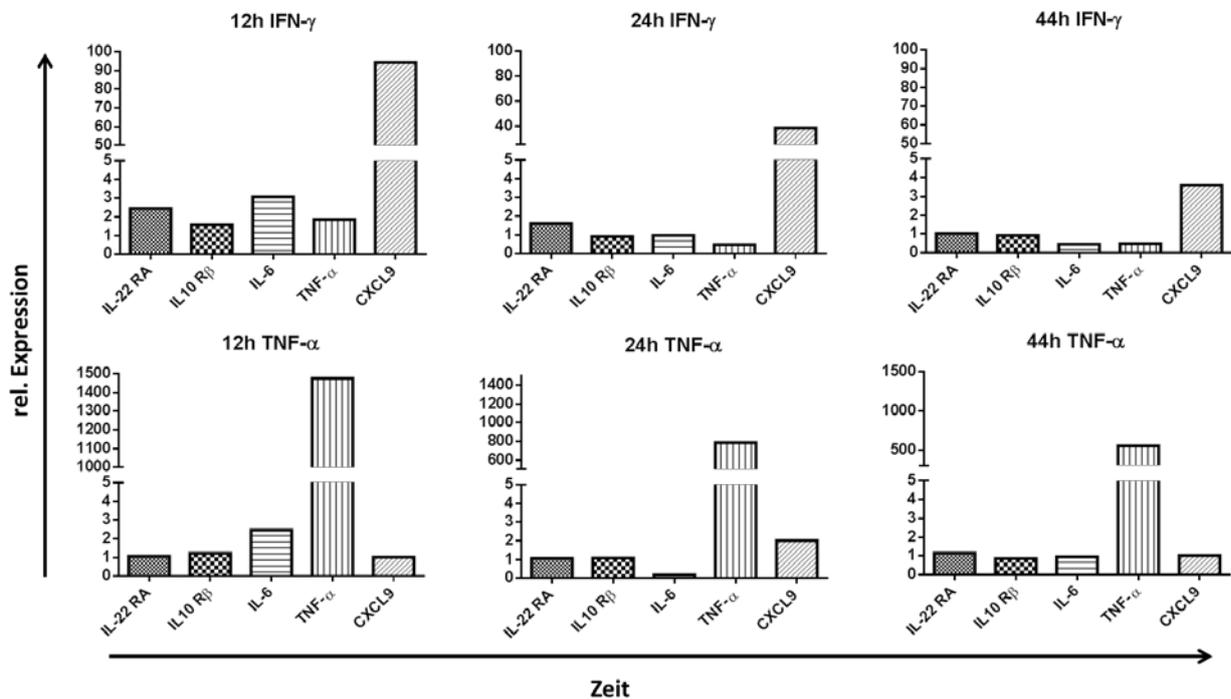


Abbildung 16: Relative Genexpression in HepG2-Zellen nach IFN- γ - bzw. TNF- α -Stimulation

Es wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR der cDNA die relative Expression verschiedener Gene (IL-22 Ra, IL-10 R β , IL-6, TNF- α und CXCL9) in HepG2-Zellen nach Stimulation mit IFN- γ (300 U/ml) und TNF- α (50 ng/ml) ermittelt. Dabei wurden die HepG2-Zellen unterschiedlich lange (12, 24 und 48 Stunden) stimuliert.

Es zeigte sich, dass die relative Expression aller Gene nach 12-stündiger Stimulation am stärksten war. Bei länger andauernder Stimulation nahm die Genexpression immer mehr ab. So betrug die relative CXCL9-Expression nach 12 Stunden IFN- γ -Stimulation 94,3, nach 24 Stunden 38,7 und nach 48 Stunden nur noch 3,6. Der gleiche Effekt zeigte sich auch unter TNF- α -Stimulation. Hier sank die relative Expression des TNF- α -Gens von 1476 nach 12 Stunden auf 788, nach 24 Stunden auf und letztlich auf 553 nach 48-stündiger Stimulation. Abbildung 17 verdeutlicht diesen

zeitlichen Verlauf der Genexpression anhand der Gene CXCL 9 bei Stimulation mit IFN- γ und TNF- α unter Stimulation mit TNF- α .

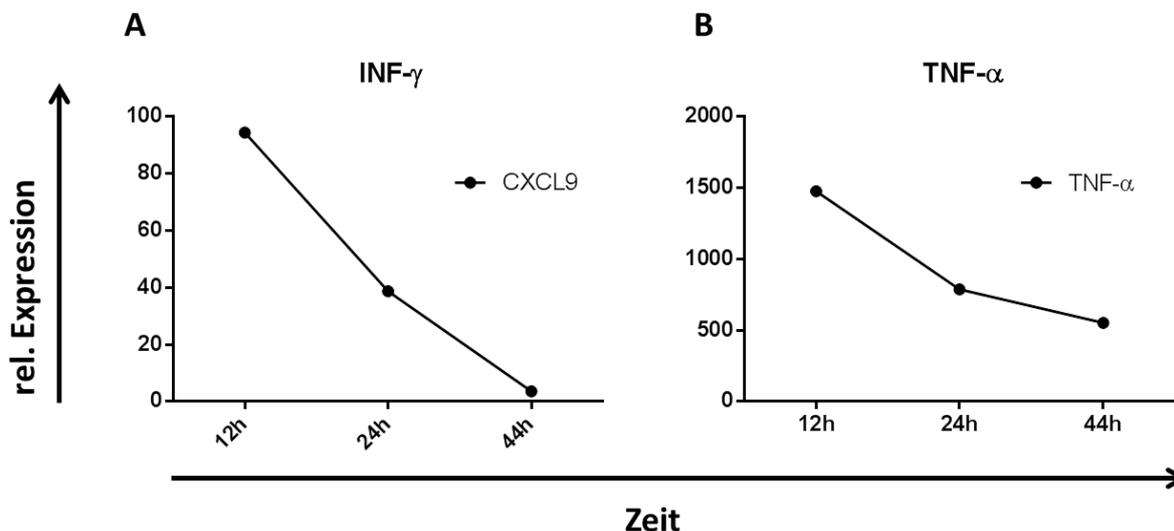


Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf der Genexpression bei HepG2-Zellen

Darstellung des zeitlichen Verlaufs der relativen Genexpression von HepG2 unter Stimulation mit IFN- γ (300 U/ml) (A) und TNF- α (50 ng/ml) (B). Dabei wurde zur besseren Übersicht im Vergleich zur Abb. 16 nur jeweils ein Gen dargestellt, CXCL 9 (A) und TNF- α (B).

Des Weiteren zeigte sich, dass IFN- γ den größten Einfluss auf die Expression des CXCL9-Gens hatte. IL-6 wurde ebenfalls leicht hochreguliert. TNF- α hingegen beeinflusste nur die Expression des TNF- α -Gens. Auf die anderen Moleküle hatte es keinen Einfluss (vgl. Abb. 16).

Sowohl bei IFN- γ - als auch bei TNF- α -Stimulation zeigte sich keine Hochregulation des IL-22-Rezeptors auf mRNA-Ebene.

Zur Ermittlung der relativen Genexpression der HepG2-Zellen nach Stimulation mit T-Zellklon-Überstand wurde daher eine Stimulationszeit von 12 Stunden gewählt.

Nach Ermittlung der optimalen Stimulationszeit wurden HepG2-Zellen mit 300 μ l Überstand der zuvor etablierten und charakterisierten T-Zellklone für 12 Stunden stimuliert und anschließend die relative Genexpression mittels Real-Time-PCR ermittelt.

Abbildung 18 zeigt die relative Expression verschiedener Gene nach Stimulation mit jeweils einem T_H-1-, T_H-2-, T_H-17- und T_H-22-Klon. Das Zytokinprofil der verwendeten T-Zellklone ist in Abbildung 11 aufgezeigt. Als Gene wurden zum einen die Rezeptoren IL22-RA/IL-10R β , TLR3 und TLR6 untersucht sowie die Botenstoffe TNF- α , IL-6, IL-7, IL-15, CXCL9, CXCL10, C1r und CFB.

Es zeigte sich eine verstärkte Expression der Botenstoffe IL-15, CXCL9, CXCL10 und C1r sowie des TLR3-Rezeptors unter allen T-Zell-Subtypen bis auf den T_H-2-Klon. Bei den restlichen Genen wurden keine nennenswerten Effekte beobachtet.

Den eindeutig größten Effekt auf die hochregulierten Gene übte der T_H-1-Klon aus, der besonders auf CXCL9 und CXCL10 einen starken Einfluss hatte. So betrug die relative Expression des CXCL9-Gens 4006 bzw. bei CXCL10 937 unter T_H-1-Stimulation. Schon im vorherigen Experiment wurde gezeigt, dass IFN- γ , das Schlüsselzytokin des T_H-1-Klons, einen großen Effekt auf die Regulation dieses Chemokins hat.

Den zweitgrößten Effekt auf die Regulation der HepG2-Gene übte der T_H-22-Klon aus. Dieser zeigte ebenfalls seinen größten Einfluss bei der Regulation von CXCL9 (*rel. Exp. 188*) bzw. CXCL10 (*rel. Exp. 37*). Doch auch bei den anderen hochregulierten Genen, bis auf TLR3, nahm er nach dem T_H-1-Klon die zweite Stelle ein.

Der T_H-17-Subtyp zeigte ähnliche, jedoch leicht schwächere Resultate wie der T_H-22-Klon. So wurde ebenfalls der stärkste Effekt bei der Regulation von CXCL9 (*rel. Exp. 58*) bzw. CXCL10 (*rel. Exp. 35*) erzielt. Lediglich bei der TLR3-Regulation konnte im Vergleich zum T_H-22-Subtyp ein größerer Effekt geltend gemacht werden (*rel. Exp. 3,9 vs. 2,7*).

Kaum eine Rolle spielte der T_H-2-Klon, der lediglich eine geringe Hochregulation von CXCL10 (*rel. Exp. 9*) und C1r (*rel. Exp. 5,7*) bewirkte.

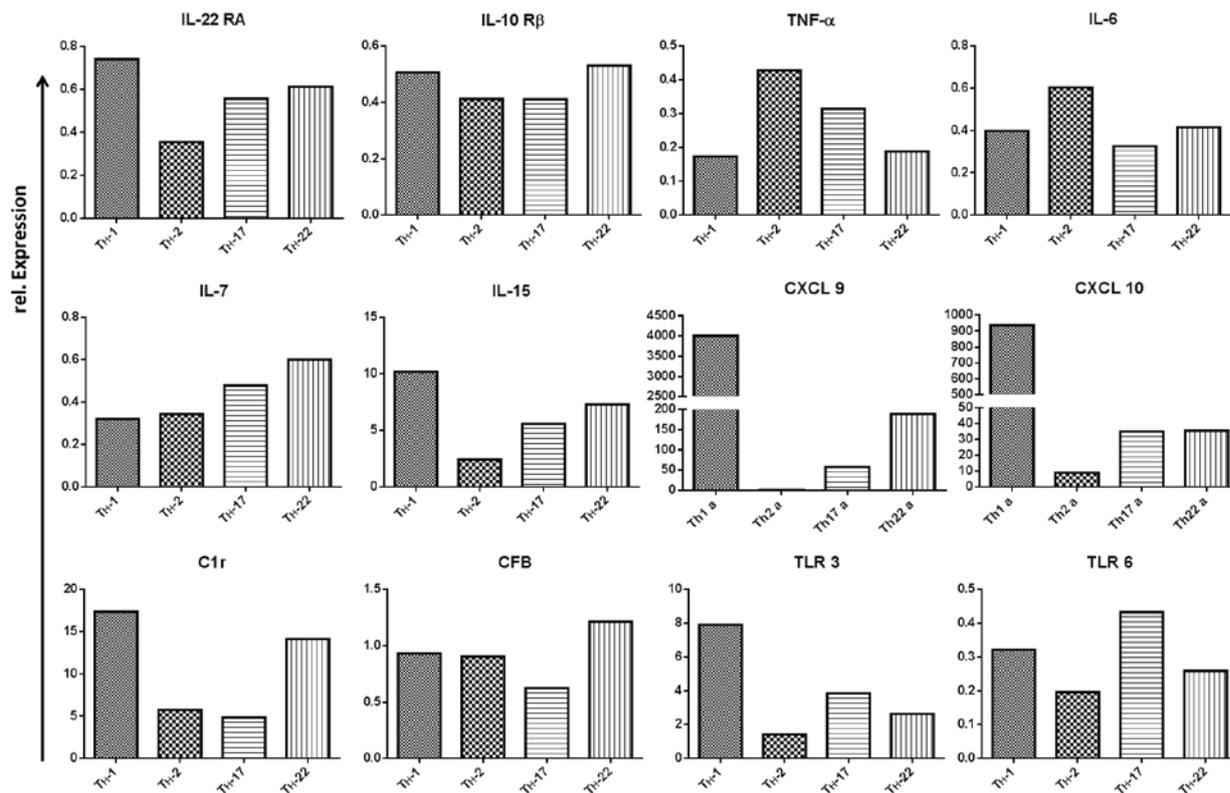


Abbildung 18: Relative Genexpression in HepG2-Zellen nach T-Zellklon-Stimulation

Mit Hilfe der Real-Time-PCR wurde die relative Expression verschiedener Gene (IL22-RA, IL-10R β , TLR3, TLR6, TNF- α , IL-6, IL-7, IL-15, CXCL9, CXCL10, C1r und CFB) in HepG2-Zellen nach Stimulation mit Überständen von TH-1-, TH-2-, TH-17- und TH-22-T-Zell-Klonen ermittelt.

4.3 Einfluss des Lebermikromilieus auf CD4⁺-Zellen

4.3.1 Zytotoxischer Effekt von Ethanol auf HepG2-Zellen

Für die Herstellung eines alkoholischen Lebermikromilieus wurden HepG2-Zellen mit Alkohol stimuliert. Um die dafür optimalen Alkoholkonzentrationen herauszufinden, wurde in einem ersten Versuch eine Ethanol-Toxizitätsreihe angesetzt. Das Ausmaß der HepG2-Toxizität wurde daraufhin durchflusszytometrisch mithilfe des Farbstoffes PI bestimmt.

Abbildung 19 zeigt den Grad der HepG2-Zellnekrose unter steigender Ethanolkonzentration. Je höher dabei die PI-Fluoreszenzintensität, desto größer war das Ausmaß der toxischen Wirkung auf die Zelle. Eine Zusammenfassung dieser Färbung ist in Abb. 20 dargestellt.

4. Ergebnisse

Ausgehend von der negativ-Kontrolle zeigte sich proportional zur Ethanolkonzentration eine steigende Zellnekrose, die bei 10 % Ethanol (EtOH) mit 100 % nekrotischen Zellen ihren Höhepunkt erreichte. Dem hohen Zellumsatz der HepG2-Zelllinie geschuldet betrug der Zellnekrose-Grad bereits in der negativ-Kontrolle 56 %. In der darauffolgenden Toxizitätsreihe stieg dieser Anteil bei 0,001 % EtOH auf 66,3 %, bei 0,01 % EtOH auf 81,1 %, bei 0,1 % EtOH auf 82,7 %, bei 1 % EtOH auf 96,3 % und bei 5 % Alkohol auf 97,3 % an.

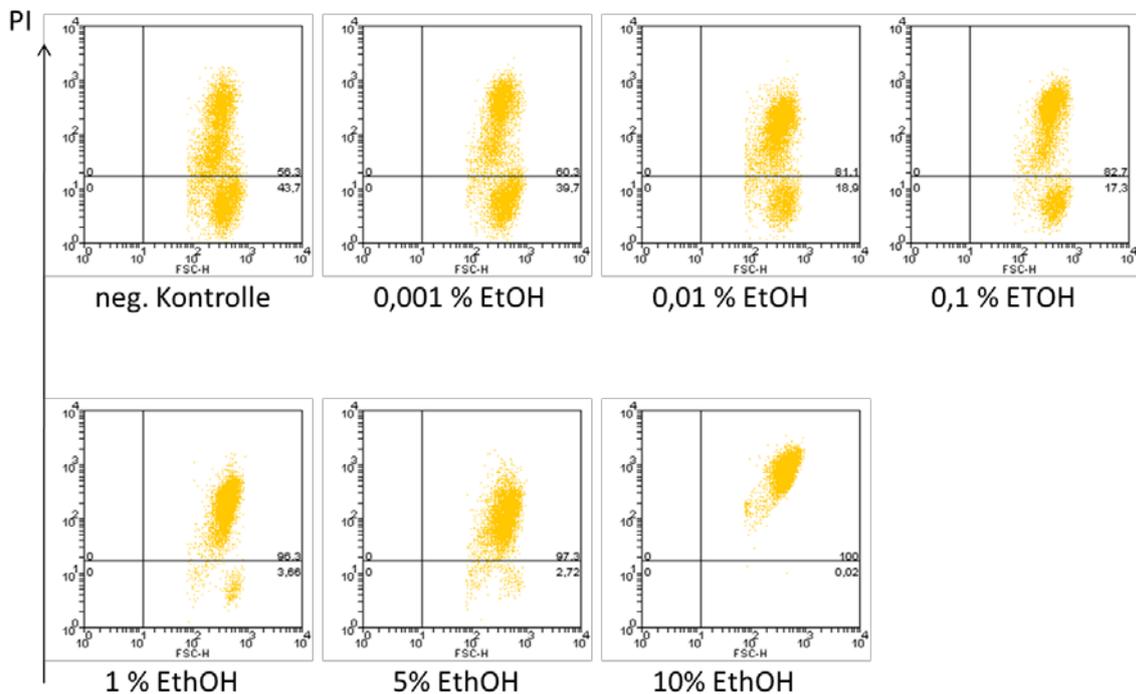


Abbildung 19: HepG2-Zelltoxizität nach Ethanol-Stimulation

Durchflusszytometrische Bestimmung der HepG2-Zellnekrose mit dem Farbstoff PI nach 48-stündiger Inkubation mit steigenden Konzentrationen von Ethanol (EtOH).

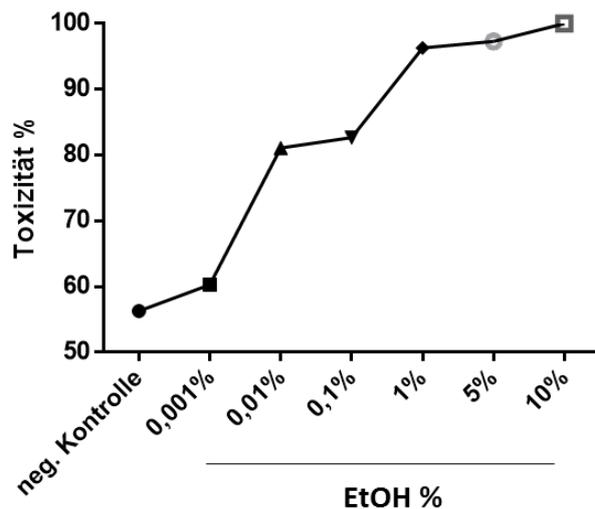


Abbildung 20: Graphische Darstellung der HepG2-Zelltoxizität nach Ethanol-Stimulation

Zusammenfassende Darstellung der durchflusszytometrisch bestimmten Zelltoxizität von HepG2-Zellen nach Stimulation mit steigenden Konzentrationen von Ethanol (EtOH).

Für die folgenden Experimente wurden die Ethanolkonzentrationen 0,001 %, 0,01 %, 0,1 % und 1 % gewählt.

Die Alkoholinkubationszeit wurde allerdings in den folgenden Versuchen von 48 Stunden auf 12 Stunden herabgesetzt.

4.3.2 *In Vitro* Einfluss eines alkoholischen Lebermikromilieus auf CD4⁺-Zellen

Zur Generierung eines alkoholischen Lebermikromilieus wurden HepG2-Zellen für 12 Stunden mit den zuvor ermittelten Ethanolkonzentrationen (s. o.) stimuliert, mehrfach gewaschen und anschließend für 48 Stunden in HepG2-Medium inkubiert. Daraufhin wurden aus dem Blut isolierte CD4⁺-Zellen mit diesem Überstand (alkoholisches Lebermikromilieu) für 72 Stunden stimuliert und ein ELISA der Zytokine IFN- γ , IL-17, IL-22, TNF- α , IL-4 und IL-10 durchgeführt. Die zusammenfassende Auswertung acht dieser Versuche ist in Abbildung 21 aufgeführt.

Bei dem jeweils ersten Balken des gemessenen Zytokins handelt es sich um die negativ-Kontrolle (vgl. Abb. 21 unstim.). Diese entspricht CD4⁺-Zellen, die mit dem Überstand von nicht mit Ethanol sondern lediglich mit HepG2-Medium inkubierten HepG2-Zellen stimuliert wurden. Die folgenden vier Balken zeigen die Zytokinausschüttung von CD4⁺-Zellen auf, die mit einem

4. Ergebnisse

unterschiedlich konzentrierten alkoholischen Lebermikromilieu stimuliert wurden (vgl. Abb. 21 EtOH 0,001, 0,01, 0,1 und 1 %).

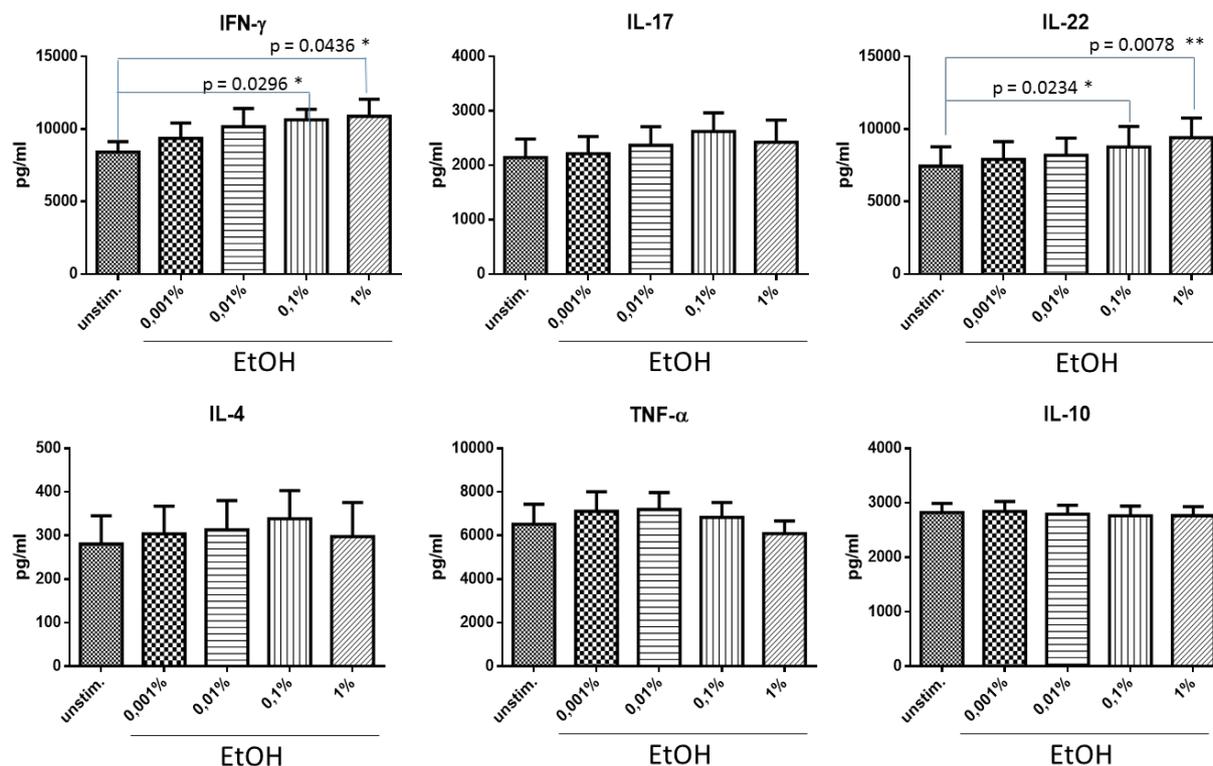


Abbildung 21: Einfluss eines alkoholischen Lebermikromilieus auf CD4⁺-Zellen (n=8)

Bestimmung verschiedener Zytokine bei CD4⁺-Zellen nach Stimulation mit einem unterschiedlich konzentrierten alkoholischen Lebermikromilieu mittels ELISA. EtOH steht für Ethanol und zeigt die unterschiedlichen verwendeten Konzentrationen an, mit denen HepG2-Zellen stimuliert wurden.

Eine signifikante Erhöhung der Zytokinproduktion der CD4⁺-Zellen im Vergleich zur negativ-Kontrolle zeigte sich sowohl bei IFN- γ als auch IL-22. Im Falle von IFN- γ wurde eine signifikante Steigerung bei 0,1 % (*p = 0,0296) bzw. bei 1 % Ethanol (*p = 0,0436) erzielt. IL-22 zeigte ebenfalls bei den Alkoholkonzentrationen 0,1 % (*p = 0,0234) und bei 1 % (**p = 0.0078) eine signifikante höhere Ausschüttung aus den CD4⁺-Zellen.

Bei den restlichen Zytokinen konnte keine signifikante Erhöhung unter Stimulation mit einem alkoholischen Lebermikromilieu festgestellt werden.

Besonders auffallend zeigte sich, dass bei dem Botenstoff IL-10 überhaupt keine Änderung der Zytokinausschüttung unter den verschiedenen Reaktionsbedingungen stattfand.

4.3.3 *In Vitro* Einfluss eines TLR3-aktivierten Lebermikromilieus auf CD4⁺-Zellen

Zur Herstellung eines TLR3-aktivierten Lebermikromilieus wurden HepG2-Zellen für 12 Stunden mit Poly I:C stimuliert, mehrfach gewaschen und anschließend für 48 Stunden in HepG2-Medium inkubiert. Daraufhin wurden aus dem Blut isolierte CD4⁺-Zellen mit diesem Überstand (TLR3-aktiviertes Lebermikromilieu) für 72 Stunden stimuliert und ein ELISA der Zytokine IFN- γ , IL-17, IL-22, TNF- α , IL-4 und IL-10 durchgeführt.

Die zusammenfassende Auswertung drei dieser Versuche ist in Abbildung 22 aufgeführt.

Der jeweils erste Balken entspricht, wie bereits zuvor erwähnt, der negativ-Kontrolle (*vgl.* 4.3.2). Der zweite und der dritte Balken zeigen die Zytokinausschüttung von CD4⁺-Zellen, die mit einem TLR3-aktivierten Lebermikromilieu stimuliert wurden. Zur Stimulierung des TLR3-Rezeptors wurden dabei 20 bzw. 50 μ g/ml Poly I:C verwendet.

Sowohl bei IFN- γ , IL-22 und TNF- α zeigten die stimulierten CD4⁺-Gruppen eine signifikante Erhöhung der Zytokinausschüttung gegenüber der negativ-Kontrolle. Im Falle von IFN- γ wurde eine signifikante Steigerung bei 20 μ g/ml (*p = 0,0151) bzw. 50 μ g/ml Poly I:C (*p = 0,0324) erzielt. IL-22 zeigte ebenfalls bei 20 μ g/ml (*p = 0,0176) bzw. 50 μ g/ml Poly I:C (**p = 0,0063) eine signifikante höhere Ausschüttung aus den CD4⁺-Zellen. Auch bei TNF- α konnte unter Stimulation mit dem TLR3-aktivierten Lebermikromilieu bei 20 μ g/ml (**p = 0,0017) und 50 μ g/ml Poly I:C (**p = 0,0025) im Vergleich zur negativ-Kontrolle ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (*vgl.* Abb. 22).

Die Botenstoffe IL-4, IL-10 und IL-17 wiesen keine signifikanten Änderungen des Zytokoinlevels auf.

4. Ergebnisse

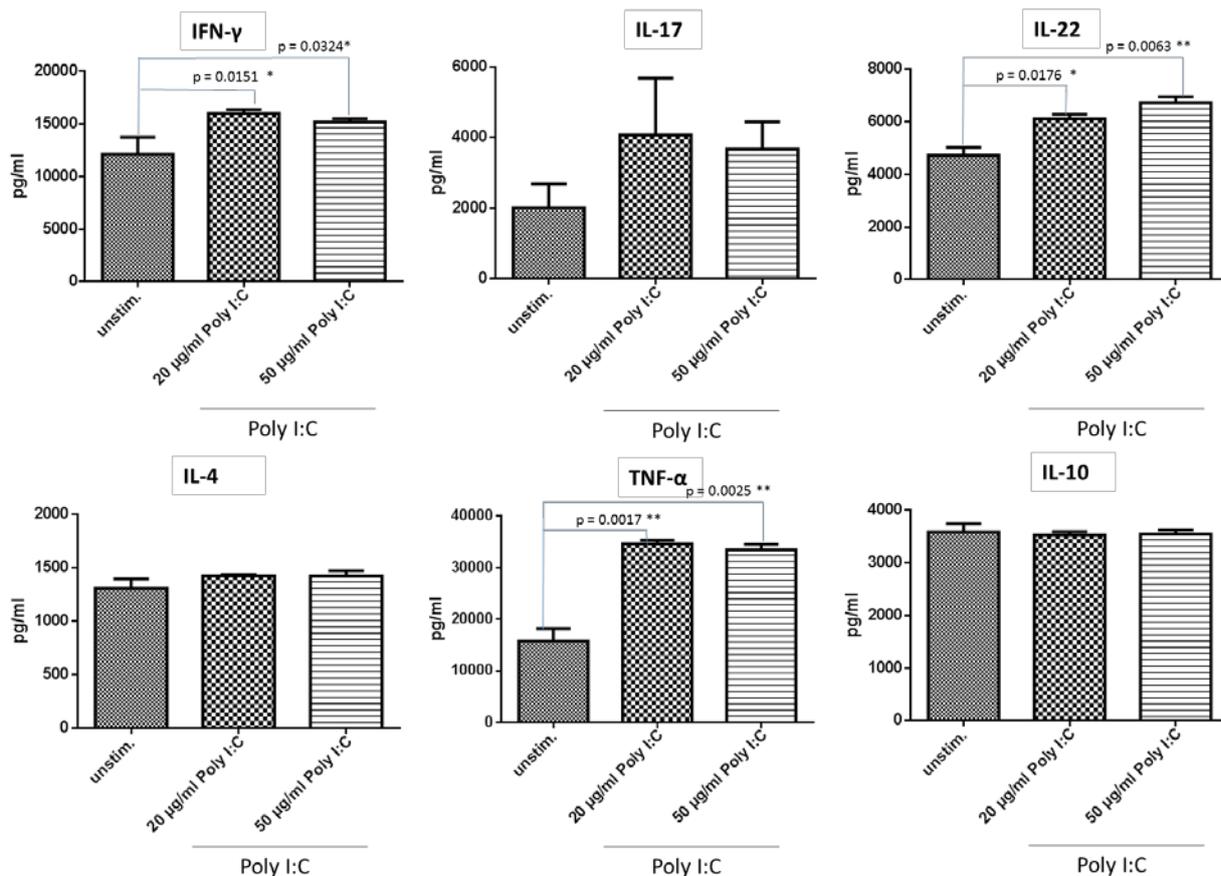


Abbildung 22: Einfluss eines TLR3-aktivierten Lebermikromilieus auf CD4⁺-Zellen (n=3)

Bestimmung verschiedener Zytokine (IFN- γ , IL-17, IL-22, IL-4, TNF- α und IL-10) von CD4⁺-Zellen nach Stimulation mit einem TLR3-aktivierten Lebermikromilieu mittels ELISA. HepG2-Zellen wurden mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen Poly I:C (20 bzw. 50 μ g/ml) für 12h stimuliert, die Zellen gewaschen und anschließend für 48h in HepG2-Medium inkubiert. Dieser Überstand wurde daraufhin zur Stimulation von CD4⁺-Zellen verwendet. Unstim. entspricht der negativ-Kontrolle.

4.4 Funktionelle Interaktion von IL-22 und IFN- γ in der T-Zellvermittelten Zytotoxizität

Interleukin 22 kontrolliert die Gewebshomöostase sowohl durch pro- als auch durch antiinflammatorische Effekte. Pennino et al. konnten in der Lunge einen antagonisierenden Effekt von IL-22 auf das proinflammatorische IFN- γ nachweisen [142]. So zeigte sich unter Einfluss von IL-22 eine Inhibierung der IFN- γ -induzierten Expression von MHC-I auf epitheliale Lungenzellen. Es wurde überdies gezeigt, dass IL-22 auch die über MHC-I vermittelte T-Zell-Zytotoxizität reduzieren konnte.

Um dieses Phänomen in der Leber zu untersuchen, wurde zunächst die MHC-I-Expression auf primären Hepatozyten unter Stimulation mit IL-22, IFN- γ und IL-22 + IFN- γ durchflusszytometrisch bestimmt. Des Weiteren wurde der Einfluss von IL-22 auf die IFN-g-vermittelte Zytotoxizität in primären Hepatozyten analysiert.

4.4.1 Durchflusszytometrische Bestimmung der MHC-I-Expression auf stimulierten primären Hepatozyten

Für die durchflusszytometrische Bestimmung der MHC-I-Expression primärer Leberzellen wurden diese für 12 Stunden mit IFN- γ (300U/ml), IL-22 (50ng/ μ l), bzw. IL-22 + IFN- γ stimuliert und anschließend durch extrazelluläre Färbung des MHC-I-Moleküls im FACS charakterisiert. In Abbildung 23 ist die Auswertung dieses Versuches abgebildet.

Es zeigte sich eine gegenüber der negativ-Kontrolle erhöhte Expression des MHC-I-Moleküls unter IFN- γ -Stimulation. Diese bekannte Induktion wurde jedoch durch zusätzlich Stimulation mit IL-22 nicht beeinflusst. Auch durch eine alleinige Stimulation der primären Leberzellen mit IL-22 konnte keine Hochregulation des MHC-I-Moleküls beobachtet werden (*vgl. Abb. 23*).

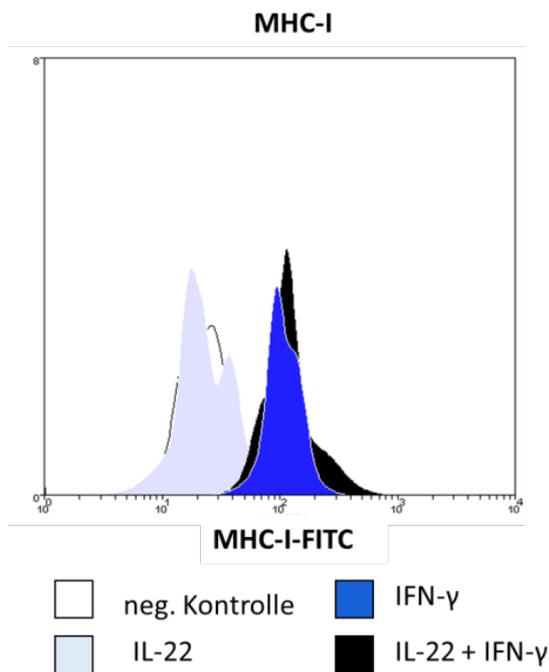


Abbildung 23: MHC-I Bestimmung auf primären Hepatozyten
Durchflusszytometrische Bestimmung des MHC-I-Moleküls auf unterschiedlich stimulierten (IFN- γ 300 U/ml, IL-22 50ng/ μ l und IL-22 + IFN- γ) primären Hepatozyten.

4.4.2 Einfluss von IL-22 auf die IFN-g-vermittelte Zytotoxizität

Um nun eine funktionell Interaktion von IL-22 und IFN-g in der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität zu untersuchen, wurden primäre Hepatozyten für 36 Stunden mit IFN- γ (300 U/ml), IL-22 (50 ng/ μ l) bzw. IL-22 + IFN- γ vorstimuliert und gewaschen. Anschließend erfolgte eine 12-stündige Stimulation dieser vorstimulierten primären Leberzellen mit aus dem Blut isolierten heterologen CD8⁺-Zellen. Da es durch die beim T-Zell-vermittelten Zelltod angerichtete Membranschädigung zu einer raschen Ausschleusung der zytosolischen Laktatdehydrogenase in das Zellkulturmedium kommt, wurde diese im Überstand mittels ELISA detektierte LDH-Aktivität als Ausmaß der toxische Schädigung der Zellen aufgefasst.

Das prozentuale Ausmaß der Zelltoxizität der primären Hepatozyten ist in Abbildung 24 dargestellt. Es zeigte sich unter Einfluss von IFN- γ mit 11,1 % bzw. unter Einfluss von IL-22 + IFN- γ mit 13,7 % eine erhöhte Toxizitätsrate im Vergleich zur Kontrolle. IL-22 alleine bewirkte mit 1,8 % lediglich eine schwache Erhöhung der Zelltoxizität. Somit bewirkt IL-22 entgegen den Daten aus der Lunge keine Reduktion der IFN-g-induzierten, T-Zell-vermittelten Zytotoxizität in der Leber.

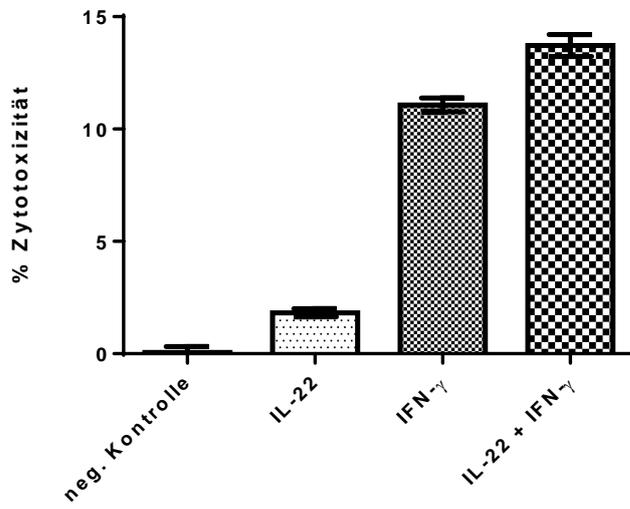


Abbildung 24: Zytotoxizitätsbestimmung primärer Hepatozyten (n=1)

Dargestellt ist das Ausmaß der Zelltoxizität verschieden vorstimulierter (IL-22, IFN- γ , IL-22 + IFN- γ) primärer Hepatozyten, welche mit zytotoxischen T-Zellen inkubiert wurden. Das Ausmaß der Zellschädigung wurde über die Bestimmung der aus der geschädigten Zelle freigesetzten LDH-Konzentration mittels ELISA bestimmt.

5. Diskussion

Während bisher vor allem die Rolle des nativen Immunsystems in der alkoholischen Lebererkrankung im Mittelpunkt der Forschung stand, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit primär mit der Bedeutung der adaptiven T-Zell-vermittelten Immunantwort in dieser Erkrankung. Dabei liegt ein besonderer Fokus auf der Rolle der erst vor kurzem entdeckten T_H-22-Zellen mit ihrem Effektorzytokin IL-22.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde dazu zunächst eine T-Zelllinie aus einer Alkohol-bedingten zirrhotischen Leberprobe etabliert und aus dieser wurden durch Klonierung einzelne T-Zellklone generiert. Anschließend wurde der Effekt dieser T-Helferzell-Subtypen auf die hepatische Zelllinie HepG2 untersucht. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss eines alkoholischen Lebermikromilieus auf CD4⁺-Zellen und im dritten Abschnitt schließlich die immunologische Bedeutung von IL-22 in der Leber untersucht.

5.1 Charakterisierung von hepatischen T-Helferzellen

In bisherigen Studien konnte eine vermehrte Infiltration von T-Zellen in die Leber während einer ALD gezeigt werden [143, 144]. Diese Befunde stellen jedoch nur einen Nachweis von T-Zellen in der Leber dar, liefern aber keine Informationen über die Wechselwirkungen der einzelnen Zellen untereinander. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Interaktion von T-Helferzellen und Hepatozyten in einem *in vitro* Modell untersucht. In einem ersten Schritt wurde dazu aus einer zirrhotischen Leberprobe eine T-Zelllinie etabliert und aus dieser wurden durch Klonierung einzelne T-Zellklone generiert. Mit diesen wurde anschließend der Effekt von T-Helferzellen in der Leber untersucht.

In der aus der Leberprobe etablierten T-Zelllinie wurden je nach dem Migrationszeitpunkt zwei Populationen unterschieden. Die eine Population wurde bereits nach 9 Tagen von der Leberprobe isoliert und enthielt daher früh ausgewanderte Zellen, während die zweite Population mit den folglich erst später aus der Leber migrierten T-Zellen erst nach weiteren 11 Tagen von der

Leberprobe abgetrennt wurde. Zwischen beiden Populationen konnten im Zuge der Charakterisierung mittels intrazellulärer Färbung gewisse Unterschiede festgestellt werden. So wiesen die früh ausgewanderten T-Zellen eine niedrigere Anzahl an IL-17- und IL-22-positiven Zellen auf. Im Falle von IL-22 wurde in den später ausgewanderten T-Zellen ein fast doppelt so hoher Anteil an positiven Zellen gemessen. Auch der Anteil an T_H-22-Zellen konnte in den spät ausgewanderten Zellen ebenfalls verdoppelt werden (0,68 ->1,4 %).

Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den sog. „spät ausgewanderten Zellen“ um gewebständige T-Zellen handelte, die einfach eine gewisse Zeit benötigten, um aus dem Gewebe in die MTP zu migrieren. Hingegen ist bei den sog. „früh ausgewanderten Zellen“ anzunehmen, dass sich diese zum großen Teil in hepatischen Gefäßen befanden und somit relativ schnell aus der Leberprobe ausströmen konnten. Diese Annahme stützt sich auch auf Beobachtungen von T-Zellen der Haut, wo ebenfalls im Vergleich zu vaskulären T-Zellen ein erhöhter Wert von gewebständigen IL-17- und IL-22-positiven Zellen festgestellt werden konnte [93].

Um die Ausbeute an T_H-22-Zellen in der Klonierung zu erhöhen, wurde in dieser Arbeit ein sog. IL-17-Secretion-Assay angewendet. Mit dieser Technik wurden möglichst viele der IL-17-produzierenden T-Zellen von der zu klonierenden T-Zelllinie abgetrennt. Da T_H-22-Zellen kein IL-17 produzieren, wurde dadurch der Anteil dieser Zellen in der T-Zell-Population erhöht.

Die Klonierung der IL-17-negativ-Fraktion erbrachte jedoch selbst im zweiten Versuch keinen einzigen T-Zellklon. Dafür sind prinzipiell zwei Ursachen vorstellbar:

Zum einen könnten die Zellen durch die mechanische Separation im MACSTM derart geschädigt worden sein, dass eine Zellproliferation in den speziellen Bedingungen der Klonierung nicht mehr möglich war. Ein anderer Grund für das fehlende Anwachsen von T-Zellklonen könnte eine mögliche Überstimulierung der T-Zellen gewesen sein. Diese wurden nämlich schon für den IL-17-Secretion-Assay mit dem Lektin PHA stimuliert und anschließend in der direkt folgenden Klonierung nochmals mit diesem maximalen Stimulus zur Proliferation angeregt. Diese Überstimulierung könnte die T-Zellen in den „activation induced cell death“, also in einen durch Aktivierung induzierten Zelltod, getrieben haben, durch den die für die Klonierung entscheidende Proliferation nicht mehr stattfinden konnte.

In der Literatur gibt es bisher kaum Beschreibungen des Zytokinprofils von hepatischen T-Zelllinien. Daher bietet sich ein Vergleich der in dieser Arbeit charakterisierten T-Zelllinie mit Daten aus der Haut an. Eyerich et al. stellten das Zytokinprofil von T-Lymphozyten in verschiedenen dermatologischen Erkrankungen wie beispielsweise der Psoriasis (PS) gegenüber [93]. Dabei zeigte sich im Vergleich zu aus PBMC stammenden T-Zellen ein signifikant höherer Anteil von IL-17- und IL-22-positiven Zellen in diesen dermatologischen Erkrankungen. So betrug der Anteil von IL-22-positiven T-Zellen im Schnitt 2,4 % in PBMC versus 15,9 % in PS. Dieselbe Tendenz zeigte sich bei IL-17-positiven T-Lymphozyten mit 2,5 % in PBMC versus 17,4 % in PS. Der Anteil an T_H-22-Zellen betrug 0,9 % in PBMC und konnte sich mit 4,4 % in PS ebenfalls in dieser Hauterkrankung steigern.

Vergleicht man diese Daten aus der Haut mit der in dieser Arbeit charakterisierten hepatischen T-Zelllinie, so zeigt sich ein ähnlicher, wenn auch schwächerer Trend. Der Anteil an IL-22-positiven gewebständigen T-Zellen betrug in der etablierten T-Zelllinie 4,1 % und ist damit ebenfalls höher als der von Eyerich et al. gemessene Anteil im Blut, jedoch deutlich niedriger als der in der PS gemessene Wert. Mit 3,8 % an IL-17-positiven hepatischen T-Zellen zeigt sich bei diesem Botenstoff eine ähnliche Tendenz. Der Anteil an T_H-22-Zellen in der etablierten T-Zelllinie betrug unter den spät ausgewanderten Zellen 1,4 % und war damit höher als der von Eyerich im Blut bestimmte Anteil, jedoch niedriger als in der PS.

Der höhere Anteil an IL-17- und IL-22-produzierenden T-Zellen in den von Eyerich et al. dargestellten Daten im Vergleich zu der hepatischen T-Zelllinie liegt vermutlich darin begründet, dass diese beiden Zytokine eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der ausgewählten Hauterkrankung spielen [98] und deshalb schon *per se* erhöht sind. Des Weiteren zeigen Studien, dass hepatisch infiltrierende T-Zellen von sowohl mit Alkohol gefütterten Mäusen als auch von chronisch Alkoholkranken nach TCR-Stimulation vornehmlich eine T_H-1-Antwort mit Produktion von IFN- γ und TNF- α ausüben [145, 146]. So wird auch allgemein in der Literatur vornehmlich der T_H-1-Typ als der dominanter T-Helferzelltyp in der Leber beschrieben [112]. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Dominanz von IFN- γ -produzierenden Zellen in der hier etablierten Leber T-Zelllinie.

Zudem stellt die Leberprobe, aus der die T-Zelllinie isoliert wurde, ein operativ entferntes zirrhotisches Lebergewebe dar. Bei der Leberzirrhose handelt es sich um die Endstufe der ALD,

die mit einer veränderten Immunantwort assoziiert ist. So wurde gezeigt, dass Patienten mit alkoholischer Leberzirrhose eine verminderte Expression des für die T-Zellaktivierung wichtigen kostimulatorischen Moleküls CD28 aufweisen und zudem die Fähigkeit von T-Zellen, den wichtigen T-Zellproliferationsbotenstoff IL-2 zu binden, verringert ist [147]. Es ist denkbar, dass dadurch die T-Helferzell-Subtypen-Verteilung verändert wird.

Als limitierender Faktor ist weiterhin zu nennen, dass in dieser Arbeit lediglich eine T-Zelllinie von einem Patienten charakterisiert wurde und daher nur bedingt Aussagen über die Verteilung von T-Helferzellen bzw. Zytokinen gemacht werden können. Für eine genauere Analyse der in der Leber vorhandenen T-Helferzellen wäre es hilfreich, zum einen das Patientenkollektiv zu erhöhen und zum anderen auch die Vorstufen der ALD zu betrachten.

Eine Einteilung der durch die Klonierung der „spät ausgewanderten“-Zellfraktion erhaltenen 37 T-Zellklone in die jeweiligen T-Helferzellpopulationen erfolgte anhand des im ELISA ermittelten Klon-Zytokinprofils. Betrachtet man die erhaltenen Klone hinsichtlich der T-Helferzell-Distribution, so zeigt sich, wie auch aus der Literatur zu erwarten [112], eine klare Dominanz des T_H -1-Typs, der über die Hälfte (59 %) der erhaltenen Klone ausmachte. Neben dieser T-Helferzellklasse konnten ebenfalls zehn T_H -0- (27 %), zwei T_H -22- (5 %) und zwei T_H -17-Klone (5 %) sowie ein T_H -2-Klon (3 %) isoliert werden.

Eine Aufteilung der Klone hinsichtlich der von ihnen gebildeten Zytokine zeigte eine Dominanz von IFN- γ (87 % aller Klone) und TNF- α (78 %). Sowohl in einer murinen wie auch in einer humanen Studie wurde gezeigt, dass diese beiden Zytokine bei vermehrtem Alkoholkonsum in der Leber besonders erhöht sind [145, 146]. Da die isolierten T-Zellklone aus einer alkoholkranken Leber stammen, könnte dies, neben der Dominanz des IFN- γ - und TNF- α -produzierenden T_H -1-Typs in der Leber, eine Erklärung für den hohen Anteil dieser Zytokine sein.

Eine Diskrepanz zwischen dem Klon-Zytokinprofil und dem der T-Zelllinie zeigte sich bei IL-22 und IL-17. Mit einem Anteil von 35 % IL-22- bzw. 8 % IL-17-positiven Klone wiesen diese einen deutlich höheren Anteil auf, als der in der intrazellulären Färbung gemessene Wert der T-Zelllinie (IL-22: 4,1 %; IL-17: 3,8 %). Diese Unterschiede liegen vermutlich an der geringen Anzahl der isolierten Klone, mit denen noch keine Normalverteilung erreicht werden konnte. Andere Studien,

die einen solchen Vergleich eingehen, haben in der Regel ein wesentlich größeres Klonkollektiv [93].

Neben der immunchemischen Charakterisierung der T-Zellklone wurde das Zytokinprofil einiger Klone auch durchflusszytometrisch mittels einer intrazellulären Färbung ermittelt. Beim Vergleich dieser beiden Methoden zeigten sich jedoch bei manchen Klonen Unstimmigkeiten. So wies beispielsweise ein T_H-1-Klon, der im ELISA kein IL-17 produzierte, im FACS eine IL-17-positive Population auf. Diese Differenz könnte an der unterschiedlichen Stimulierung der T-Zellklone liegen. So werden die im ELISA charakterisierten Klone zur Produktion von Zytokinen mittels antiCD3/antiCD28 stimuliert, was eine Aktivierung *in vivo* widerspiegelt. Für die durchflusszytometrische Charakterisierung hingegen wurde eine den TCR umgehende Aktivierung über PMA/Ionomycin verwendet. Mit dieser Methode werden die Zellen wesentlich stärker aktiviert, was eventuell zur Produktion von Zytokinen führt, welche unter TCR-Stimulation nicht beobachtet werden würden.

Für zukünftige Experimente sollte daher zur genaueren Einteilung der Klone in die T-Helferzell-Subpopulationen neben dem in dieser Arbeit verwendeten Zytokinprofil zusätzlich eine Analyse der Subpopulations-spezifischen Transkriptionsfaktoren und auch die Expression von spezifischen Oberflächenrezeptoren wie z. B. Chemokinrezeptoren mit einbezogen werden.

5.2 Einfluss von T-Helferzellen in der Leber

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass aus der Leber isolierte T-Helferzell-Klone bestimmte Gene in der Leberzelllinie HepG2 induzieren können. Untersucht wurden als Zielgene zum einen die Rezeptoren IL22-RA/IL-10R β , TLR3 und TLR6 sowie die Botenstoffe TNF- α , IL-6, IL-7, IL-15, CXCL9, CXCL10, C1r und CFB.

Mit der Auswahl dieser Gene sollte untersucht werden, inwiefern die T-Helferzellsubtypen die immunologische Reaktion der Leber beeinflussen können. So dienen die Chemokine CXCL9 und CXCL10 der Aktivierung und Migration von T-Zellen in die Leber [117, 118]. Interleukin 15, welches IL-2 strukturell sehr ähnlich ist, verstärkt die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen und wurde bei seiner Entdeckung 1994 auch als „T-Zell-Wachstumsfaktor“ bezeichnet [148]. Interleukin 7 wird für das Überleben der meisten T-Zellsubtypen benötigt und soll unter

anderem auch wichtig für die Regulierung der Anzahl an T-Zellen sein [149]. Interleukin 6 zeigt neben seinen akuten Effekten, wie der Auslösung der Akute-Phase-Reaktion mit Freisetzung von Bestandteilen des Komplementsystems wie C1r und CFB sowie der Rekrutierung von Immunzellen, auch eine wichtige Rolle in der Differenzierung von T-Helferzellen [150]. Für alle diese drei Interleukine sowie das stark proinflammatorische Zytokin TNF- α wurde eine Expression in der Leber beschrieben [151-154]. Die zur angeborenen Immunität gehörenden Toll-like-Rezeptoren TLR3 bzw. TLR6 werden ebenfalls in der Leber exprimiert, erkennen PAMPs und dienen der viralen bzw. bakteriellen Abwehr.

Es zeigte sich eine Hochregulation der Botenstoffe IL-15, CXCL9, CXCL10 und C1r sowie des TLR3-Rezeptors. Dabei konnten gewisse Unterschiede zwischen den verschiedenen T-Helferzellpopulationen (T_H -1, T_H -2, T_H -17, T_H -22) beobachtet werden.

Den größten Effekt zeigte hierbei der IFN- γ -produzierende T_H -1-Klon, der bei allen hochregulierten Genen die stärkste Wirkung erzielte. Im Hinblick auf die hepatischen T-Zellsubtypen-Verteilung mit T_H -1 als dominantem Typ [112] sowie auf die immunologische Rolle der Leber als viraler Manifestationsort [124, 155] war ein solches Ergebnis im Vorfeld zu erwarten. Die höchste Expression wurde dabei bei den T-Zell-anlockenden und antimikrobiellen Chemokinen CXCL9 und CXCL10 festgestellt. Auch das für das T-Zell-Überleben und die Proliferation wichtige IL-15 wurde von dem T_H -1-Klon hochreguliert. Zusammen mit der verstärkten Expression des dsRNA-erkennenden TLR3-Rezeptors spiegeln diese Ergebnisse einige wichtige antivirale Effekte des T_H -1-Typs in der Leber wider.

Den zweitgrößten Effekt auf die Regulation der betrachteten Zielmoleküle in HepG2-Zellen wies der T_H -22-Klon auf.

Damit das Effektorzytokin IL-22 dieser T-Zellpopulation überhaupt auf die Leberzelllinie Einfluss nehmen konnte, musste diese den IL-22-Rezeptor exprimieren. In der Literatur konnte bereits gezeigt werden, dass humane Hepatozyten diesen Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche aufweisen [156-158]. In dieser Arbeit wurde dargestellt, dass auch die hepatische Tumorzelllinie HepG2 den für den T_H -22-Typ wichtigen IL-22-Rezeptor konstitutiv exprimierte und nach Stimulation mit IFN- γ bzw. TNF- α sogar vermehrt auf ihrer Zelloberfläche aufwies.

Aufgrund ihres Chemokinrezeptorprofils (v. a. CCR4 u. CCR10) wird der T_H-22-Typ im besonderen Maße mit der Haut in Verbindung gebracht, da hier die jeweiligen Chemokinliganden exprimiert werden [94]. Die erhöhte Expression des an den T_H-22-charakteristischen CCR10-Rezeptor bindenden CCL28-Liganden auf Hepatozyten und Cholangiozyten unter inflammatorischen Bedingungen zeigt, dass T_H-22-Zellen womöglich auch vermehrt in entzündetem Lebergewebe angetroffen werden können. So wird in inflammatorischen Lebererkrankungen eine erhöhte Anzahl an CCR10-positiven T-Zellen beobachtet [127, 159].

Wie auch schon bei Keratinozyten der Haut dargestellt [93], bewirkte der T_H-22-Klon bei den HepG2-Zellen eine Hochregulation in den Genen für CXCL9, CXCL10, IL-15, C1r und TLR3. Jedoch zeigte sich keine, wie in der Haut beschriebene, verstärkte Expression von IL-7, CFB und TLR-6.

Der Vergleich dieser Ergebnisse legt nahe, dass T_H-22-Zellen in der Leber womöglich ähnliche Funktionen wie in der Haut zu haben scheinen. Dazu zählt vor allem die Bewahrung der epithelialen Integrität durch Induzierung der Proliferation und Migration von Epithelzellen. Neben diesen protektiven Funktionen können sie jedoch im entzündeten Gewebe auch zu einer Verstärkung der inflammatorischen Immunantwort beitragen [98].

Da bei den hier ermittelten Ergebnissen lediglich jeweils ein Vertreter einer T-Helferzell-Subpopulation verwendet wurde, müssen diese Resultate in nachfolgenden Versuchen mit einem größeren Kollektiv von Klonen bestätigt werden. Zudem muss beachtet werden, dass es sich bei den verwendeten Leberzellen nicht um primäre Hepatozyten handelt, sondern um eine entartete hepatische Tumorzelllinie. Für zukünftige Versuche empfiehlt es sich daher, um möglichst nahe an *in vivo* Bedingungen zu bleiben, den Effekt von T-Zellen auf primärer Leberzellen zu erforschen.

5.3 Wechselwirkung von T-Zellen und Leberzellen in der ALD

In den vorherigen Abschnitten wurde dargelegt, dass aus der Leber isolierte T-Helferzellen Hepatozyten spezifisch aktivieren können. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde hingegen der Einfluss von Hepatozyten auf T-Zellen erforscht.

In bisherigen Studien konnte gezeigt werden, dass das adaptive Immunsystem in der ALD eine wichtige Rolle zu spielen scheint [137]. So zeigt sich unter anderem eine erhöhte Anzahl intrahepatischer T-Lymphozyten in dieser Erkrankung [130]. Die Rolle dieser Zellen ist jedoch noch unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher, um die Funktion von T-Zellen in dieser Erkrankung zu ergründen, der Einfluss eines alkoholischen Lebermikromilieus auf die Zytokinproduktion von CD4⁺-Zellen anhand eines *in vitro* Modells untersucht.

In der Auswertung dieser Versuche zeigte sich, dass CD4⁺-Zellen bei Kontakt mit einem alkoholischen Lebermilieu eine signifikant höhere Produktion von IFN- γ und IL-22 aufwiesen. Die restlichen Botenstoffe (IL-4, IL-10, IL-17 und TNF- α) wiesen keine signifikanten Änderungen auf.

Mit Alkohol versetzte Leberzellen scheinen also CD4⁺-Zellen selektiv zur Produktion von IFN- γ und IL-22 anzuregen.

In der Literatur werden in der ALD sowohl Erhöhungen von proinflammatorischen, leberschädigenden wie auch von antinflammatorischen, hepatoprotektiven Zytokinen beschrieben [160]. Als prominentester Vertreter der ersten Kategorie und somit als einer der Hauptverursacher des Leberschadens wird TNF- α aufgeführt [160, 161]. Jedoch werden auch erhöhte Level des proinflammatorischen IFN- γ [161] und IL-17 [134, 161] in ALD-Lebern gemessen. Unter den hepatoprotektiven Zytokinen wird eine verstärkte Präsenz von IL-6, IL-10 und IL-22 in alkoholkranken Lebern beobachtet [160-162]. Als zelluläre Quelle dieser Zytokine werden Epithelzellen und unterschiedliche Immunzellen, darunter auch CD4⁺-T-Zellen beschrieben [160-162].

Vergleicht man diese in der Literatur beschriebenen Beobachtung mit denen in dem ALD *in vitro* Modell gemessenen Daten dieser Arbeit, so zeigt sich in beiden Fällen eine vermehrte Produktion von IL-22 und IFN- γ . Demnach könnten hepatische CD4⁺-Zellen für die verstärkte Expression dieser beiden Zytokine in alkoholkranken Lebern verantwortlich sein.

Diese Arbeit liefert womöglich auch den zu Grunde liegenden Mechanismus, der in alkoholinduzierten Erkrankungen zu einem vermehrten Vorkommen dieser beiden Botenstoffe führt. So beschrieben Lai et al., dass RNA von nekrotischen bzw. apoptotischen Zellen den TLR3-Rezeptor auf unbeschädigten Keratinozyten stimulieren kann und dadurch eine lokale Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen auslöst [163]. TLR3 fungiert dementsprechend als wichtiger

Sensor für die Erkennung von Gewebsschäden und nicht nur als ein Virus-erkennender PRR. Die vorliegende Arbeit gibt Anhalt dazu, dass ein ähnlicher Mechanismus auch in der Leber existiert. So konnte gezeigt werden, dass Ethanol eine toxische Wirkung auf HepG2-Zellen hatte und in zunehmender Konzentration einen verstärkten Zelltod herbeiführte. Folglich könnte die aus den toten Leberzellen freigesetzte RNA an den TLR3-Rezeptor von noch vitalen Hepatozyten binden und dadurch eine Entzündungsreaktion auslösen. Tatsächlich zeigte sich nach Stimulation der CD4⁺-Zellen mit einem durch Poly I:C, TLR3 aktivierten Lebermikromilieu ebenfalls eine signifikante Erhöhung der IL-22- und IFN- γ -Ausschüttung, aber kein Unterschied in der IL-10-Produktion. Es konnte also durch TLR3-Stimulation der gleiche Effekt wie unter Ethanol-Stimulation beobachtet werden. Somit ist anzunehmen, dass die gesteigerte Produktion von IL-22 und IFN- γ in der ALD über diesen Mechanismus ausgelöst wird. Die mögliche Rolle von IL-22 in der ALD wird dabei in *Punkt 5.4* diskutiert.

Eine Diskrepanz zwischen den literarischen und den in dieser Arbeit ermittelten Daten zeigte sich hingegen bei IL-10 und TNF- α ., da diese Zytokine unter dem alkoholischen Lebermikromilieu in CD4⁺-Zellen nicht hochreguliert wurden. Dass die Mehrheit dieser beiden Zytokine wahrscheinlich von den leberansässigen Kupffer-Zellen stammt und nicht von CD4⁺-T-Zellen, stellt eine mögliche Erklärung dieser Beobachtung dar [160].

Bei den in diesem *in vitro* Modell verwendeten, aus dem Blut isolierten, CD4⁺-Zellen handelt es sich überdies um eine andere Zellpopulation wie die in der Leber ansässigen CD4⁺-Zellen. Für zukünftige Experimente wäre es daher empfehlenswert, den Versuch mit aus der Leber isolierten CD4⁺- oder Gesamt-T-Zellen und anstelle von HepG2-Zellen mit primären Hepatozyten zu wiederholen. Des Weiteren könnte eine immunhistochemische Färbung verschiedener Zytokine in ALD-Erkrankungen genaueren Aufschluss über das Ausmaß und die Verteilung dieser Botenstoffe geben.

5.3 Immunologische Rolle von IL-22 in der Leber

Um die Rolle von IL-22 in der Leber genauer zu beleuchten, wurde im dritten Teil dieser Arbeit die Regulation des MHC-I-Moleküls auf primären Hepatozyten unter unterschiedlichen Stimulationsbedingungen erforscht.

Pennino et al. zeigten in der Lunge, dass IL-22 die proinflammatorischen Effekte von IFN- γ unterdrücken konnte [142]. Dabei wurde unter anderem beschrieben, dass IL-22 die T-Zell-vermittelte Toxizität auf epitheliale Lungenzellen vermindern konnte, indem es die IFN- γ -induzierte Expression von MHC-I unterdrückte. Es wurde daher in dieser Studie geschlussfolgert, dass IL-22 möglicherweise das Ausmaß der IFN- γ -vermittelten Inflammation in der Lunge kontrollieren kann und folglich eine eher regulatorische Rolle in diesem Gewebe ausübt.

Im Gegensatz zu den von Pennino in der Lunge beschriebenen Daten zeigten sich bei den primären Hepatozyten weder eine verminderte MHC-I-Expression noch eine verminderte Zelltoxizität unter der Kombination von IFN- γ und IL-22 im Vergleich zu IFN- γ alleine. Wo in der Lunge unter der Kombinationsstimulation, im Vergleich zu lediglich IFN- γ , eine signifikante Abnahme der T-Zell-vermittelten Toxizität beschrieben wurde, zeigte sich bei den primären Hepatozyten sogar eher eine leichte Zunahme.

Dies lässt annehmen, dass IL-22 in der Leber, zumindest auf die MHC-I-Expression bezogen, keinen antagonisierenden Effekt auf die proinflammatorischen Effekte von IFN- γ hat. Dies bestätigen auch Daten aus einem HBV-Mausmodell, in dem gezeigt wurde, dass die Neutralisation von IL-22 in der Leber keinen Effekt auf die IFN- γ -vermittelte virale Abwehr hatte [164].

Um die Rolle von IL-22 und IFN- γ in der menschlichen Leber abschließend zu beurteilen, empfiehlt es sich im Weiteren, eine Genexpressionsanalyse von primären humanen Hepatozyten anzufertigen.

5.4 Hypothese zur Rolle von T_H-22 /IL-22 in der ALD

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es unter den aus einer Alkohol-bedingten zirrhotischen Leber stammenden IL-22-produzierenden T-Zellen eine konstante Population an T_H-22-Zellen gibt und dass diese mit den IL-22-Rezeptor-exprimierenden Hepatozyten spezifisch interagieren können. Des Weiteren zeigte sich, dass CD4⁺-Zellen in dem *in vitro* Umfeld eines alkoholischen Lebermikromilieus vermehrt das Effektorzytokin IL-22 dieser T-Helferzellpopulation sezernieren. Es lässt sich daher annehmen, dass T_H-22-Zellen bzw. IL-22 eine wichtige Rolle in der ALD einnehmen. Im folgenden Abschnitt sollen daher ihre mögliche

Bedeutung und ihr therapeutisches Potential in der alkoholischen Lebererkrankung beleuchtet werden.

Das zur IL-10-Zytokinfamilie gehörende IL-22, welches primär von T_H-17-, T_H-22- und NK22-Zellen produziert wird, wirkt aufgrund der IL-22-Rezeptor-Verteilung im Gegensatz zu anderen Zytokinen nur auf Gewebszellen und nicht auf Immunzellen [97, 157]. Die Signalübertragung erfolgt dabei primär über den Transkriptionsfaktor STAT3 und bewirkt die Expression von akuten inflammatorischen Proteinen, die Aktivierung von proliferativen und/oder anti-apoptotischen Programmen und die Induzierung von antimikrobiellen Genen [141, 165-167]. IL-22 scheint daher die Antwort des Gewebes auf das Immunsystem zu kontrollieren.

Die Literatur beschreibt eine Vielzahl an Studien, in denen die IL-22-Produktion, primär in inflammatorischen oder infektiösen Erkrankungen, erhöht ist. Dabei zeigt sich, dass dieser Botenstoff, abhängig vom Kontext der Erkrankung, entweder eine protektive oder eine pathogene Rolle einnehmen kann. So wurde beispielsweise eine wichtige protektive Funktion von IL-22 in der Abwehr von Bakterien in der Lunge beschrieben [103, 168], wohingegen IL-22 in der Pathogenese der Psoriasis eher eine krankheitsfördernde Wirkung aufzuweisen scheint [169].

In der Leber gibt es die meiste Evidenz für eine protektive Rolle von IL-22 im Schutz vor hepatozellulärem Schaden. So zeigt sich ein IL-22-vermittelter Schutz bei T-Zell-vermittelter muriner Hepatitis über eine STAT3-bedingte Leberzellregeneration [170, 171]. IL-22-defiziente Mäuse scheinen hingegen hoch anfällig gegenüber einer ConA-ausgelösten Hepatitis zu sein [171]. Des Weiteren zeigen neue Studien, dass Leber-spezifische IL-22-transgene Mäuse resistent gegen die Auslösung einer ConA-vermittelten Hepatitis sind [172]. Die Überexpression von IL-22 verbesserte in diesen Mäusen überdies die Leberregeneration nach partieller Hepatektomie, hatte jedoch nur minimale Effekte auf eine Leberinflammation. Im Einklang damit wurde bei durch mit Serumentzug geschädigten HepG2-Zellen unter stabiler IL-22-Überexpression eine verstärkte Expression von mitogenen (c-myc, cyclin D1, CDK4) und antiapoptotischen (Mcl1, Bcl-xL, Bcl-2) Proteinen festgestellt [170].

Trotz dieser gut etablierten protektiven Rolle gibt es auch Daten, die eine pathogene Funktion von IL-22 in der Leber aufzeigen. So leistet IL-22 in bestimmtem Kontext direkt oder indirekt einen Beitrag zum Leberschaden, indem es die Migration von inflammatorischen Zellen in die Leber auslöst und dadurch den T-Zell-vermittelten Leberschaden verstärkt. IL-22-Neutralisation

verringerte demnach in einem HBV-Modell den Leberschaden [164]. Als ein weiterer potentiell schädlicher Effekt wird die Rolle von IL-22 im Tumorwachstum von hepatozellulärem Karzinom (HCC) gesehen. So zeigte eine Studie, dass die proliferativen und anti-apoptotischen Effekte von IL-22 das Wachstum von bestehenden HCC beschleunigen, jedoch den Tumor an sich nicht auslösen können [172, 173].

In der alkoholischen Lebererkrankung bestätigen bisherige Studien vor allem eine protektive Rolle von IL-22. So konnte in einem Maus-Modell gezeigt werden, dass die Behandlung von mit Alkohol gefütterten Mäusen mit IL-22 vor alkoholischen Leberschäden schützte [174]. Dieser Mechanismus scheint vor allem STAT3 vermittelt zu sein, da eine Deletion dieses Transkriptionsfaktors in diesem Modell die hepatoprotektiven Effekte von IL-22 unterdrückte [174]. Der in diesen Studien beobachtete Effekt ist daher wahrscheinlich über die STAT3-bedingte Hochregulation von anti-apoptotischen und anti-oxidativen Genen und die verringerte Expression von lipogenen Genen in Hepatozyten bedingt [174]. IL-22 bestätigt damit seine Rolle als hepatozellulärer Überlebensfaktor gegen Toxin-induzierte Leberschäden.

Die in dieser Arbeit beobachtete verstärkte IL-22-Produktion von CD4⁺-Zellen in einem alkoholischen Lebermikromilieu könnte somit als interner Schutzmechanismus gewertet werden, der bis zu einem gewissen Punkt einen weiteren Leberschaden verhindern und eine verstärkte Leberregeneration auslösen kann. Als zu Grunde liegender Mechanismus könnte, wie schon im *in vitro* Modell dargestellt, der durch Alkohol ausgelöste Leberschaden auch *in vivo* über TLR3 detektiert werden und Immunzellen zur Produktion von IL-22 anregen.

Als mögliche primäre Quelle von Interleukin 22 in der ALD ist vorstellbar, dass die in dieser Arbeit aus einer zirrhotischen Leber nachgewiesenen und etablierten T_H-22-Zellen fungieren können. So zeigten Patienten mit alkoholische Hepatitis eine erhöhte Frequenz an IL-22-produzierenden T-Helferzellen [162]. Interessanterweise war dieser Effekt am stärksten in Patienten, deren Erkrankung sich zu verbessern schien. Für eine erhöhte Anzahl an T_H-22-Zellen spricht weiterhin, dass die für die Differenzierung in diesen Zelltyp wichtigen Zytokine IL-6 und TNF- α in alkoholischen Lebererkrankungen vermehrt exprimiert werden [93, 144].

Betrachtet man die anti-apoptotischen und proliferativen Effekte von IL-22 in der Leber, so liegt eine Beteiligung dieses Botenstoffs an der in den späteren Stadien der ALD eintretenden Fibrose zunächst auf der Hand. Neue Forschungsergebnisse zeigen jedoch, dass IL-22 womöglich eher

eine antifibrotische Wirkung aufweist [175-177]. Verantwortlich für eine Leberfibrose sind die parasinuoidalen Ito-Zellen, welche durch einen Leberschaden aktiviert werden und die primäre Quelle von extrazellulärer Matrix in dieser Erkrankung darstellen [178]. Diese Zellen weisen eine starke Expression des IL-22-Rezeptors auf. In einem Maus-Modell löste IL-22 in den Ito-Zellen über Aktivierung von STAT3, SOCS3 und p53 eine Seneszenz aus und reduzierte dadurch die hepatische Fibrose [175]. Im Einklang stehen diese Resultate mit Daten aus humanen Lebern von chronischen Hepatitis-B-Patienten, die eine negative Korrelation zwischen der IL-22-Expression und dem Fibrosegrad aufzeigten [177].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die hepatoprotektiven, mitogenen und antifibrotischen Effekte von IL-22 förderlich in der Verbesserung eines alkoholischen Leberschadens sein können und womöglich sogar eine eintretende Fibrose verhindern können. Es liegt daher auf der Hand, IL-22 in der Behandlung der ALD einzusetzen. Die bisherige therapeutische Strategie von Glukokortikoiden ist problematisch, da die vorteilhaften antiinflammatorischen Effekte dieses Medikaments von einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen und einer verminderten Leberregeneration begleitet werden. Die Hinzunahme von IL-22 mit seinen antimikrobiellen und hepatoregenerativen Eigenschaften zu der bestehenden Therapie könnte jedoch die negativen Aspekte der Glukokortikoiden reduzieren und gleichzeitig durch die hepatoprotektiven Eigenschaften dieses Botenstoffes einen weiteren Zellschaden verhindern. Die selektive Expression des IL-22-Rezeptors auf Epithelzellen lässt überdies annehmen, dass mit einem geringen Nebenwirkungsspektrum gerechnet werden kann.

6. Zusammenfassung

Die Alkohol-induzierte Leberschädigung (ALD) ist weltweit eine der Hauptursachen für chronische Lebererkrankungen und der häufigste Grund von Zirrhose und Leberversagen in der westlichen Welt. Laut dem amerikanischen „National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism“ war die Leberzirrhose im Jahr 2007 die zwölft häufigste Todesursache in den USA mit insgesamt 29.925 Todesfällen. Nahezu die Hälfte dieser Todesfälle war Alkohol-induziert. Neben dem hochgradig gesundheitsschädlichen Aspekt zeigt auch die volkswirtschaftliche Belastung mit jährlichen Kosten von 27,3 Milliarden Euro in Deutschland die enorme Relevanz dieser Erkrankung. Trotz dieser Tragweite wurden seit über 40 Jahren, aufgrund der unzureichend verstandenen Pathophysiologie der ALD, keine neuen Therapeutika erfolgreich entwickelt.

Bisherige Forschungsarbeiten fokussierten sich vor allem auf die Rolle des nativen Immunsystems in der ALD. Eine erhöhte Anzahl von hepatischen T-Lymphozyten in alkoholkranken Lebern zeigt jedoch, dass auch das adaptive Immunsystem eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Über die Funktion dieser Zellen in der ALD ist jedoch noch wenig bekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Bedeutung der adaptiven T-Zell-vermittelten Immunantwort in der ALD zu untersuchen. Dabei wurde ein besonderer Fokus auf die Rolle der erst vor kurzem entdeckten T_H-22-Zellen mit ihrem Leitzytokin IL-22 gelegt.

In der vorliegenden Arbeit wurden aus einer Alkohol-induzierten zirrhotischen Leberprobe durch Reihenverdünnung einer etablierten T-Zelllinie T-Helferzellklone generiert. Anschließend wurde die funktionelle Interaktion der verschiedenen T-Helferzell-Subtypen mit der hepatischen Zelllinie HepG2 untersucht. Des Weiteren wurde der Einfluss eines *in vitro* erzeugten alkoholischen Lebermikromilieus auf die Zytokinexpression von CD4⁺-Zellen evaluiert und die Rolle von IL-22 in der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität untersucht.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es unter den aus einer Alkohol-induzierten zirrhotischen Leber stammenden T-Zellen eine konstante Population an T_H-22 Zellen gibt und dass diese mit den IL-22-Rezeptor-exprimierenden Hepatozyten spezifisch interagieren können. Diese Interaktion führt u. a. zur Induktion von CXCL-9, CXCL-10, IL-15, und TLR3 in Hepatozyten. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass CD4⁺-Zellen in einem alkoholischen Lebermikromilieu verstärkt mit der Ausschüttung des Leitzytokins der T_H-22-Zellen, IL-22,

reagieren und dass dies möglicherweise durch TLR3 als Sensor für Alkohol-induzierte Gewebeschäden vermittelt ist. Abschließend konnte gezeigt werden, dass IL-22 in der Leber, im Gegensatz zur Lunge, keinen antagonisierenden Effekt auf die IFN- γ -induzierte, zellvermittelte Zytotoxizität hat.

Betrachtet man die in der Literatur beschriebenen überwiegend hepatoprotektiven, mitogenen und antifibrotischen Effekte von T_H-22 / IL-22 in der Leber, können die Ergebnisse dieser Arbeit zusammenfassend als eine Art Mechanismus zur internen Schutzfunktion in der Verhinderung bzw. Abschwächung eines alkoholischen Leberschadens verstanden werden. Die vorliegende Arbeit unterstreicht somit die Bedeutung der Interaktion von T-Zellen und Hepatozyten im Rahmen einer alkoholischen Lebererkrankung. Die Ergebnisse könnten in Zukunft zu der Verwendung von IL-22 in neuen Therapieansätzen führen und damit die Prognose dieser Erkrankung wesentlich verbessern.

Literaturverzeichnis

1. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, A. Baker, D.L. Baker, S. Pillai, and ebrary Inc, *Cellular and molecular immunology*. 2012, Elsevier/Saunders: Philadelphia.
2. Travis, J., *Origins. On the origin of the immune system*. Science, 2009. **324**(5927): p. 580-2.
3. Longo, D.L., M. Dietel, T.R. Harrison, and Charité - Universitätsmedizin Berlin, *Harrisons Innere Medizin*. 18. Aufl., dt. Ausg., Sonderausg. ed. 2013, [Berlin]
4. Silverstein, A.M., *Cellular versus humoral immunology: a century-long dispute*. Nat Immunol, 2003. **4**(5): p. 425-8.
5. Herold, G., *Innere Medizin 2014 : eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. 2014, Köln: Selbstverl. 1001 S.
6. Kuo, I.H., T. Yoshida, A. De Benedetto, and L.A. Beck, *The cutaneous innate immune response in patients with atopic dermatitis*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **131**(2): p. 266-78.
7. Hoffmann, J. and S. Akira, *Innate immunity*. Curr Opin Immunol, 2013. **25**(1): p. 1-3.
8. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition*. Cell, 1997. **91**(3): p. 295-8.
9. Li, J.P., Y. Chen, C.H. Ng, M.L. Fung, A. Xu, B. Cheng, S.W. Tsao, and W.K. Leung, *Differential expression of Toll-like receptor 4 in healthy and diseased human gingiva*. J Periodontal Res, 2014.
10. Hodgkin, P.D., *Concepts for the development of a quantitative theory of clonal selection and class regulation using lessons from the original*. Immunol Cell Biol, 2008. **86**(2): p. 161-5.
11. Heath, W.R. and F.R. Carbone, *Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces*. Nat Immunol, 2009. **10**(12): p. 1237-44.
12. Cresswell, P., *Invariant chain structure and MHC class II function*. Cell, 1996. **84**(4): p. 505-7.
13. Jenkins, M.K., A. Khoruts, E. Ingulli, D.L. Mueller, S.J. McSorley, R.L. Reinhardt, A. Itano, and K.A. Pape, *In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 23-45.
14. Pamer, E. and P. Cresswell, *Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 323-58.
15. Bodey, B., B. Bodey, Jr., S.E. Siegel, and H.E. Kaiser, *Molecular biological ontogenesis of the thymic reticulo-epithelial cell network during the organization of the cellular microenvironment*. In Vivo, 1999. **13**(3): p. 267-94.
16. Morrison, L.A., A.E. Lukacher, V.L. Braciale, D.P. Fan, and T.J. Braciale, *Differences in antigen presentation to MHC class I-and class II-restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clones*. J Exp Med, 1986. **163**(4): p. 903-21.
17. Flajnik, M.F. and L. Du Pasquier, *Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line?* Trends Immunol, 2004. **25**(12): p. 640-4.
18. Taghon, T., M.A. Yui, R. Pant, R.A. Diamond, and E.V. Rothenberg, *Developmental and molecular characterization of emerging beta- and gammadelta-selected pre-T cells in the adult mouse thymus*. Immunity, 2006. **24**(1): p. 53-64.
19. Marrack, P., K. Rubtsova, J. Scott-Browne, and J.W. Kappler, *T cell receptor specificity for major histocompatibility complex proteins*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(2): p. 203-7.
20. Hayday, A.C., *[gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 975-1026.

21. Tanaka, Y., C.T. Morita, Y. Tanaka, E. Nieves, M.B. Brenner, and B.R. Bloom, *Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells*. Nature, 1995. **375**(6527): p. 155-8.
22. Bauer, S., V. Groh, J. Wu, A. Steinle, J.H. Phillips, L.L. Lanier, and T. Spies, *Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA*. Science, 1999. **285**(5428): p. 727-9.
23. Ley, K. and G.S. Kansas, *Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(5): p. 325-35.
24. Surh, C.D. and J. Sprent, *Homeostasis of naive and memory T cells*. Immunity, 2008. **29**(6): p. 848-62.
25. Thomas, M.L., *The leukocyte common antigen family*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 339-69.
26. Clement, L.T., *Isoforms of the CD45 common leukocyte antigen family: markers for human T-cell differentiation*. J Clin Immunol, 1992. **12**(1): p. 1-10.
27. Michie, C.A., A. McLean, C. Alcock, and P.C. Beverley, *Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms*. Nature, 1992. **360**(6401): p. 264-5.
28. Sharpe, A.H., *Mechanisms of costimulation*. Immunol Rev, 2009. **229**(1): p. 5-11.
29. Lafferty, K.J., L. Andrus, and S.J. Prowse, *Role of lymphokine and antigen in the control of specific T cell responses*. Immunol Rev, 1980. **51**: p. 279-314.
30. DeFord-Watts, L.M., D.S. Dougall, S. Belkaya, B.A. Johnson, J.L. Eitson, K.T. Roybal, B. Barylko, J.P. Albanesi, C. Wulfiging, and N.S. van Oers, *The CD3 zeta subunit contains a phosphoinositide-binding motif that is required for the stable accumulation of TCR-CD3 complex at the immunological synapse*. J Immunol, 2011. **186**(12): p. 6839-47.
31. June, C.H., J.A. Ledbetter, P.S. Linsley, and C.B. Thompson, *Role of the CD28 receptor in T-cell activation*. Immunol Today, 1990. **11**(6): p. 211-6.
32. Linsley, P.S., W. Brady, M. Urnes, L.S. Grosmaire, N.K. Damle, and J.A. Ledbetter, *CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7*. J Exp Med, 1991. **174**(3): p. 561-9.
33. Sharpe, A.H. and G.J. Freeman, *The B7-CD28 superfamily*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(2): p. 116-26.
34. Li, W.X., H.F. Pan, G.P. Chen, J.H. Tao, X.P. Li, and D.Q. Ye, *Expression of inducible co-stimulator on peripheral blood T lymphocytes in patients with lupus nephritis*. Rheumatol Int, 2012. **32**(7): p. 2051-5.
35. Paulos, C.M., C. Carpenito, G. Plesa, M.M. Suhoski, A. Varela-Rohena, T.N. Golovina, R.G. Carroll, J.L. Riley, and C.H. June, *The inducible costimulator (ICOS) is critical for the development of human T(H)17 cells*. Sci Transl Med, 2010. **2**(55): p. 55ra78.
36. Zhu, J. and W.E. Paul, *CD4 T cells: fates, functions, and faults*. Blood, 2008. **112**(5): p. 1557-69.
37. Veldhoen, M., *The role of T helper subsets in autoimmunity and allergy*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(6): p. 606-11.
38. Annunziato, F. and S. Romagnani, *Heterogeneity of human effector CD4+ T cells*. Arthritis Res Ther, 2009. **11**(6): p. 257.
39. Amsen, D., C.G. Spilianakis, and R.A. Flavell, *How are T(H)1 and T(H)2 effector cells made?* Curr Opin Immunol, 2009. **21**(2): p. 153-60.
40. Constant, S.L. and K. Bottomly, *Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 297-322.
41. Tao, X., S. Constant, P. Jorritsma, and K. Bottomly, *Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for Th1 and Th2 CD4+ T cell differentiation*. J Immunol, 1997. **159**(12): p. 5956-63.
42. Kapsenberg, M.L., *Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(12): p. 984-93.

43. Schweitzer, A.N., F. Borriello, R.C. Wong, A.K. Abbas, and A.H. Sharpe, *Role of costimulators in T cell differentiation: studies using antigen-presenting cells lacking expression of CD80 or CD86*. J Immunol, 1997. **158**(6): p. 2713-22.
44. Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher, *Functional diversity of helper T lymphocytes*. Nature, 1996. **383**(6603): p. 787-93.
45. Mosmann, T.R., H. Cherwinski, M.W. Bond, M.A. Giedlin, and R.L. Coffman, *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
46. Salmi, M. and S. Jalkanen, *Lymphocyte homing to the gut: attraction, adhesion, and commitment*. Immunol Rev, 2005. **206**: p. 100-13.
47. Kobayashi, K., N. Nakata, M. Kai, T. Kasama, Y. Hanyuda, and Y. Hatano, *Decreased expression of cytokines that induce type 1 helper T cell/interferon-gamma responses in genetically susceptible mice infected with Mycobacterium avium*. Clin Immunol Immunopathol, 1997. **85**(1): p. 112-6.
48. Heinzl, F.P., M.D. Sadick, B.J. Holaday, R.L. Coffman, and R.M. Locksley, *Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets*. J Exp Med, 1989. **169**(1): p. 59-72.
49. Fujioka, N., R. Akazawa, K. Ohashi, M. Fujii, M. Ikeda, and M. Kurimoto, *Interleukin-18 protects mice against acute herpes simplex virus type 1 infection*. J Virol, 1999. **73**(3): p. 2401-9.
50. Micallef, M.J., K. Yoshida, S. Kawai, T. Hanaya, K. Kohno, S. Arai, T. Tanimoto, K. Torigoe, M. Fujii, M. Ikeda, and M. Kurimoto, *In vivo antitumor effects of murine interferon-gamma-inducing factor/interleukin-18 in mice bearing syngeneic Meth A sarcoma malignant ascites*. Cancer Immunol Immunother, 1997. **43**(6): p. 361-7.
51. Hsieh, C.S., S.E. Macatonia, C.S. Tripp, S.F. Wolf, A. O'Garra, and K.M. Murphy, *Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages*. Science, 1993. **260**(5107): p. 547-9.
52. Lighvani, A.A., D.M. Frucht, D. Jankovic, H. Yamane, J. Aliberti, B.D. Hissong, B.V. Nguyen, M. Gadina, A. Sher, W.E. Paul, and J.J. O'Shea, *T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(26): p. 15137-42.
53. Thieu, V.T., Q. Yu, H.C. Chang, N. Yeh, E.T. Nguyen, S. Sehra, and M.H. Kaplan, *Signal transducer and activator of transcription 4 is required for the transcription factor T-bet to promote T helper 1 cell-fate determination*. Immunity, 2008. **29**(5): p. 679-90.
54. Kaplan, M.H., Y.L. Sun, T. Hoey, and M.J. Grusby, *Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice*. Nature, 1996. **382**(6587): p. 174-7.
55. Thierfelder, W.E., J.M. van Deursen, K. Yamamoto, R.A. Tripp, S.R. Sarawar, R.T. Carson, M.Y. Sangster, D.A. Vignali, P.C. Doherty, G.C. Grosveld, and J.N. Ihle, *Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells*. Nature, 1996. **382**(6587): p. 171-4.
56. Kopach, P., V. Lockett, E.M. Pickering, R.E. Haskell, R.D. Anderson, J.D. Hasday, N.W. Todd, I.G. Luzina, and S.P. Atamas, *IFN-gamma directly controls IL-33 protein level through a STAT1- and LMP2-dependent mechanism*. J Biol Chem, 2014.
57. Afkarian, M., J.R. Sedy, J. Yang, N.G. Jacobson, N. Cereb, S.Y. Yang, T.L. Murphy, and K.M. Murphy, *T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells*. Nat Immunol, 2002. **3**(6): p. 549-57.
58. Mullen, A.C., F.A. High, A.S. Hutchins, H.W. Lee, A.V. Villarino, D.M. Livingston, A.L. Kung, N. Cereb, T.P. Yao, S.Y. Yang, and S.L. Reiner, *Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection*. Science, 2001. **292**(5523): p. 1907-10.

59. Djuretic, I.M., D. Levanon, V. Negreanu, Y. Groner, A. Rao, and K.M. Ansel, *Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(2): p. 145-53.
60. Naoe, Y., R. Setoguchi, K. Akiyama, S. Muroi, M. Kuroda, F. Hatam, D.R. Littman, and I. Taniuchi, *Repression of interleukin-4 in T helper type 1 cells by Runx/Cbf beta binding to the Il4 silencer*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1749-55.
61. Usui, T., J.C. Preiss, Y. Kanno, Z.J. Yao, J.H. Bream, J.J. O'Shea, and W. Strober, *T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription*. J Exp Med, 2006. **203**(3): p. 755-66.
62. Finkelman, F.D., E.J. Pearce, J.F. Urban, Jr., and A. Sher, *Regulation and biological function of helminth-induced cytokine responses*. Immunol Today, 1991. **12**(3): p. A62-6.
63. de Vries, J.E., J. Punnonen, B.G. Cocks, R. de Waal Malefyt, and G. Aversa, *Regulation of the human IgE response by IL4 and IL13*. Res Immunol, 1993. **144**(8): p. 597-601.
64. Sanderson, C.J., *Interleukin-5, eosinophils, and disease*. Blood, 1992. **79**(12): p. 3101-9.
65. Swain, S.L., A.D. Weinberg, M. English, and G. Huston, *IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors*. J Immunol, 1990. **145**(11): p. 3796-806.
66. Kaplan, M.H., U. Schindler, S.T. Smiley, and M.J. Grusby, *Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells*. Immunity, 1996. **4**(3): p. 313-9.
67. Yagi, R., J. Zhu, and W.E. Paul, *An updated view on transcription factor GATA3-mediated regulation of Th1 and Th2 cell differentiation*. Int Immunol, 2011. **23**(7): p. 415-20.
68. Zhu, J., H. Yamane, J. Cote-Sierra, L. Guo, and W.E. Paul, *GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors*. Cell Res, 2006. **16**(1): p. 3-10.
69. Mosmann, T.R. and S. Sad, *The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more*. Immunol Today, 1996. **17**(3): p. 138-46.
70. Bailis, W., Y. Yashiro-Ohtani, T.C. Fang, R.D. Hatton, C.T. Weaver, D. Artis, and W.S. Pear, *Notch simultaneously orchestrates multiple helper T cell programs independently of cytokine signals*. Immunity, 2013. **39**(1): p. 148-59.
71. Maggi, E., *The TH1/TH2 paradigm in allergy*. Immunotechnology, 1998. **3**(4): p. 233-44.
72. Romagnani, S., *The role of lymphocytes in allergic disease*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(3): p. 399-408.
73. Yao, Z., S.L. Painter, W.C. Fanslow, D. Ulrich, B.M. Macduff, M.K. Spriggs, and R.J. Armitage, *Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells*. J Immunol, 1995. **155**(12): p. 5483-6.
74. Harrington, L.E., R.D. Hatton, P.R. Mangan, H. Turner, T.L. Murphy, K.M. Murphy, and C.T. Weaver, *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1123-32.
75. Park, H., Z. Li, X.O. Yang, S.H. Chang, R. Nurieva, Y.H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian, and C. Dong, *A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1133-41.
76. Liang, S.C., X.Y. Tan, D.P. Luxenberg, R. Karim, K. Dunussi-Joannopoulos, M. Collins, and L.A. Fouser, *Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides*. J Exp Med, 2006. **203**(10): p. 2271-9.
77. Wan, Y.Y. and R.A. Flavell, *How diverse--CD4 effector T cells and their functions*. J Mol Cell Biol, 2009. **1**(1): p. 20-36.
78. Annunziato, F., L. Cosmi, V. Santarlasci, L. Maggi, F. Liotta, B. Mazzinghi, E. Parente, L. Fili, S. Ferri, F. Frosali, F. Giudici, P. Romagnani, P. Parronchi, F. Tonelli, E. Maggi, and S. Romagnani, *Phenotypic and functional features of human Th17 cells*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1849-61.

79. Infante-Duarte, C., H.F. Horton, M.C. Byrne, and T. Kamradt, *Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells*. J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6107-15.
80. Huang, W., L. Na, P.L. Fidel, and P. Schwarzenberger, *Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice*. J Infect Dis, 2004. **190**(3): p. 624-31.
81. Koenders, M.I. and W.B. van den Berg, *Translational mini-review series on Th17 cells: are T helper 17 cells really pathogenic in autoimmunity?* Clin Exp Immunol, 2010. **159**(2): p. 131-6.
82. Eyerich, S., K. Eyerich, A. Cavani, and C. Schmidt-Weber, *IL-17 and IL-22: siblings, not twins*. Trends Immunol, 2010. **31**(9): p. 354-61.
83. Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka, and V.K. Kuchroo, *IL-17 and Th17 Cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 485-517.
84. Roeleveld, D.M., A.E. van Nieuwenhuijze, W.B. van den Berg, and M.I. Koenders, *The Th17 pathway as a therapeutic target in rheumatoid arthritis and other autoimmune and inflammatory disorders*. BioDrugs, 2013. **27**(5): p. 439-52.
85. Nakae, S., A. Nambu, K. Sudo, and Y. Iwakura, *Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 6173-7.
86. Crome, S.Q., A.Y. Wang, and M.K. Levings, *Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease*. Clin Exp Immunol, 2010. **159**(2): p. 109-19.
87. Yang, L., D.E. Anderson, C. Baecher-Allan, W.D. Hastings, E. Bettelli, M. Oukka, V.K. Kuchroo, and D.A. Hafler, *IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells*. Nature, 2008. **454**(7202): p. 350-2.
88. Manel, N., D. Unutmaz, and D.R. Littman, *The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma*. Nat Immunol, 2008. **9**(6): p. 641-9.
89. Volpe, E., N. Servant, R. Zollinger, S.I. Bogiatzi, P. Hupe, E. Barillot, and V. Soumelis, *A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses*. Nat Immunol, 2008. **9**(6): p. 650-7.
90. Nurieva, R., X.O. Yang, G. Martinez, Y. Zhang, A.D. Panopoulos, L. Ma, K. Schluns, Q. Tian, S.S. Watowich, A.M. Jetten, and C. Dong, *Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 480-3.
91. Yeh, W.I., I.L. McWilliams, and L.E. Harrington, *IFN-gamma inhibits Th17 differentiation and function via Tbet-dependent and Tbet-independent mechanisms*. J Neuroimmunol, 2014. **267**(1-2): p. 20-7.
92. Duhon, T., R. Geiger, D. Jarrossay, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto, *Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells*. Nat Immunol, 2009. **10**(8): p. 857-63.
93. Eyerich, S., K. Eyerich, D. Pennino, T. Carbone, F. Nasorri, S. Pallotta, F. Cianfarani, T. Odorisio, C. Traidl-Hoffmann, H. Behrendt, S.R. Durham, C.B. Schmidt-Weber, and A. Cavani, *Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling*. J Clin Invest, 2009. **119**(12): p. 3573-85.
94. Trifari, S., C.D. Kaplan, E.H. Tran, N.K. Crellin, and H. Spits, *Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells*. Nat Immunol, 2009. **10**(8): p. 864-71.
95. Basu, R., D.B. O'Quinn, D.J. Silberger, T.R. Schoeb, L. Fouser, W. Ouyang, R.D. Hatton, and C.T. Weaver, *Th22 cells are an important source of IL-22 for host protection against enteropathogenic bacteria*. Immunity, 2012. **37**(6): p. 1061-75.

96. Trifari, S. and H. Spits, *IL-22-producing CD4+ T cells: middle-men between the immune system and its environment*. Eur J Immunol, 2010. **40**(9): p. 2369-71.
97. Wolk, K. and R. Sabat, *Interleukin-22: a novel T- and NK-cell derived cytokine that regulates the biology of tissue cells*. Cytokine Growth Factor Rev, 2006. **17**(5): p. 367-80.
98. Cavani, A., D. Pennino, and K. Eyerich, *Th17 and Th22 in skin allergy*. Chem Immunol Allergy, 2012. **96**: p. 39-44.
99. Kotenko, S.V., L.S. Izotova, O.V. Mirochnitchenko, E. Esterova, H. Dickensheets, R.P. Donnelly, and S. Pestka, *Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes*. J Biol Chem, 2001. **276**(4): p. 2725-32.
100. Renauld, J.C., *Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(8): p. 667-76.
101. Kotenko, S.V., L.S. Izotova, O.V. Mirochnitchenko, E. Esterova, H. Dickensheets, R.P. Donnelly, and S. Pestka, *Identification, cloning, and characterization of a novel soluble receptor that binds IL-22 and neutralizes its activity*. J Immunol, 2001. **166**(12): p. 7096-103.
102. Akdis, M., O. Palomares, W. van de Veen, M. van Splunter, and C.A. Akdis, *TH17 and TH22 cells: a confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(6): p. 1438-49; quiz1450-1.
103. Aujla, S.J., Y.R. Chan, M. Zheng, M. Fei, D.J. Askew, D.A. Pociask, T.A. Reinhart, F. McAllister, J. Edeal, K. Gaus, S. Husain, J.L. Kreindler, P.J. Dubin, J.M. Pilewski, M.M. Myerburg, C.A. Mason, Y. Iwakura, and J.K. Kolls, *IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia*. Nat Med, 2008. **14**(3): p. 275-81.
104. Zhang, N., H.F. Pan, and D.Q. Ye, *Th22 in inflammatory and autoimmune disease: prospects for therapeutic intervention*. Mol Cell Biochem, 2011. **353**(1-2): p. 41-6.
105. Baba, N., M. Rubio, L. Kenins, C. Regairaz, M. Woisetschlager, J.M. Carballido, and M. Sarfati, *The aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligand VAF347 selectively acts on monocytes and naive CD4(+) Th cells to promote the development of IL-22-secreting Th cells*. Hum Immunol, 2012. **73**(8): p. 795-800.
106. Veldhoen, M., K. Hirota, A.M. Westendorf, J. Buer, L. Dumoutier, J.C. Renauld, and B. Stockinger, *The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins*. Nature, 2008. **453**(7191): p. 106-9.
107. Kmiec, Z., *Cooperation of liver cells in health and disease*. Adv Anat Embryol Cell Biol, 2001. **161**: p. lii-xiii, 1-151.
108. Weibel, E.R., W. Staubli, H.R. Gnagi, and F.A. Hess, *Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver*. J Cell Biol, 1969. **42**(1): p. 68-91.
109. Bouwens, L., P. De Bleser, K. Vanderkerken, B. Geerts, and E. Wisse, *Liver cell heterogeneity: functions of non-parenchymal cells*. Enzyme, 1992. **46**(1-3): p. 155-68.
110. Racanelli, V. and B. Rehermann, *The liver as an immunological organ*. Hepatology, 2006. **43**(2 Suppl 1): p. S54-62.
111. Doherty, D.G. and C. O'Farrelly, *Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver*. Immunol Rev, 2000. **174**: p. 5-20.
112. Crispe, I.N., *Hepatic T cells and liver tolerance*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(1): p. 51-62.
113. Gao, B., W.I. Jeong, and Z. Tian, *Liver: An organ with predominant innate immunity*. Hepatology, 2008. **47**(2): p. 729-36.
114. Liaskou, E., D.V. Wilson, and Y.H. Oo, *Innate immune cells in liver inflammation*. Mediators Inflamm, 2012. **2012**: p. 949157.

115. Wong, J., B. Johnston, S.S. Lee, D.C. Bullard, C.W. Smith, A.L. Beaudet, and P. Kubes, *A minimal role for selectins in the recruitment of leukocytes into the inflamed liver microvasculature*. J Clin Invest, 1997. **99**(11): p. 2782-90.
116. MacPhee, P.J., E.E. Schmidt, and A.C. Groom, *Intermittence of blood flow in liver sinusoids, studied by high-resolution in vivo microscopy*. Am J Physiol, 1995. **269**(5 Pt 1): p. G692-8.
117. Shields, P.L., C.M. Morland, M. Salmon, S. Qin, S.G. Hubscher, and D.H. Adams, *Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver*. J Immunol, 1999. **163**(11): p. 6236-43.
118. Goddard, S., A. Williams, C. Morland, S. Qin, R. Gladue, S.G. Hubscher, and D.H. Adams, *Differential expression of chemokines and chemokine receptors shapes the inflammatory response in rejecting human liver transplants*. Transplantation, 2001. **72**(12): p. 1957-67.
119. Lalor, P.F., P. Shields, A. Grant, and D.H. Adams, *Recruitment of lymphocytes to the human liver*. Immunol Cell Biol, 2002. **80**(1): p. 52-64.
120. Katz, S.C., V.G. Pillarisetty, J.I. Bleier, A.B. Shah, and R.P. DeMatteo, *Liver sinusoidal endothelial cells are insufficient to activate T cells*. J Immunol, 2004. **173**(1): p. 230-5.
121. Herkel, J., B. Jagemann, C. Wiegard, J.F. Lazaro, S. Lueth, S. Kanzler, M. Blessing, E. Schmitt, and A.W. Lohse, *MHC class II-expressing hepatocytes function as antigen-presenting cells and activate specific CD4 T lymphocytes*. Hepatology, 2003. **37**(5): p. 1079-85.
122. Wiegard, C., P. Wolint, C. Frenzel, U. Cheruti, E. Schmitt, A. Oxenius, A.W. Lohse, and J. Herkel, *Defective T helper response of hepatocyte-stimulated CD4 T cells impairs antiviral CD8 response and viral clearance*. Gastroenterology, 2007. **133**(6): p. 2010-8.
123. Warren, A., D.G. Le Couteur, R. Fraser, D.G. Bowen, G.W. McCaughan, and P. Bertolino, *T lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells*. Hepatology, 2006. **44**(5): p. 1182-90.
124. Crispe, I.N., *The liver as a lymphoid organ*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 147-63.
125. Erhardt, A., M. Biburger, T. Papadopoulos, and G. Tiegs, *IL-10, regulatory T cells, and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver injury in mice*. Hepatology, 2007. **45**(2): p. 475-85.
126. Lohr, H.F., J.F. Schlaak, G. Gerken, B. Fleischer, H.P. Dienes, and K.H. Meyer zum Buschenfelde, *Phenotypical analysis and cytokine release of liver-infiltrating and peripheral blood T lymphocytes from patients with chronic hepatitis of different etiology*. Liver, 1994. **14**(3): p. 161-6.
127. Shetty, S., P.F. Lalor, and D.H. Adams, *Lymphocyte recruitment to the liver: molecular insights into the pathogenesis of liver injury and hepatitis*. Toxicology, 2008. **254**(3): p. 136-46.
128. Rehm, J., A.V. Samokhvalov, and K.D. Shield, *Global burden of alcoholic liver diseases*. J Hepatol, 2013. **59**(1): p. 160-8.
129. Helman, R.A., M.H. Temko, S.W. Nye, and H.J. Fallon, *Alcoholic hepatitis. Natural history and evaluation of prednisolone therapy*. Ann Intern Med, 1971. **74**(3): p. 311-21.
130. Gao, B. and R. Bataller, *Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets*. Gastroenterology, 2011. **141**(5): p. 1572-85.
131. Cederbaum, A.I., *Alcohol metabolism*. Clin Liver Dis, 2012. **16**(4): p. 667-85.
132. Bode, C. and J.C. Bode, *Activation of the innate immune system and alcoholic liver disease: effects of ethanol per se or enhanced intestinal translocation of bacterial toxins induced by ethanol?* Alcohol Clin Exp Res, 2005. **29**(11 Suppl): p. 166s-71s.
133. Rao, R., *Endotoxemia and gut barrier dysfunction in alcoholic liver disease*. Hepatology, 2009. **50**(2): p. 638-44.

134. Lemmers, A., C. Moreno, T. Gustot, R. Marechal, D. Degre, P. Demetter, P. de Nadai, A. Geerts, E. Quertinmont, V. Vercruysee, O. Le Moine, and J. Deviere, *The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease*. Hepatology, 2009. **49**(2): p. 646-57.
135. Gomez-Quiroz, L., L. Bucio, V. Souza, C. Escobar, B. Farfan, E. Hernandez, M. Konigsberg, F. Vargas-Vorackova, D. Kershenobich, and M.C. Gutierrez-Ruiz, *Interleukin 8 response and oxidative stress in HepG2 cells treated with ethanol, acetaldehyde or lipopolysaccharide*. Hepatol Res, 2003. **26**(2): p. 134-141.
136. Miller, Y.I., S.H. Choi, P. Wiesner, L. Fang, R. Harkewicz, K. Hartvigsen, A. Boullier, A. Gonen, C.J. Diehl, X. Que, E. Montano, P.X. Shaw, S. Tsimikas, C.J. Binder, and J.L. Witztum, *Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity*. Circ Res, 2011. **108**(2): p. 235-48.
137. Albano, E., *Role of adaptive immunity in alcoholic liver disease*. Int J Hepatol, 2012. **2012**: p. 893026.
138. Ohashi, T., J. Tanabe, T. Ishikawa, A. Okumura, K. Sato, M. Ayada, N. Hotta, T. Kuzuya, H. Ito, H. Nakao, M. Yoneda, and S. Kakumu, *Inflammatory cytokines modulate chemokine production patterns of HepG2 cells toward initially inclined direction*. Hepatol Res, 2009. **39**(5): p. 510-9.
139. Moshage, H., *Cytokines and the hepatic acute phase response*. J Pathol, 1997. **181**(3): p. 257-66.
140. Stonans, I., E. Stonane, S. Russwurm, H.P. Deigner, K.J. Bohm, M. Wiederhold, L. Jager, and K. Reinhart, *HepG2 human hepatoma cells express multiple cytokine genes*. Cytokine, 1999. **11**(2): p. 151-6.
141. Boniface, K., F.X. Bernard, M. Garcia, A.L. Gurney, J.C. Lecron, and F. Morel, *IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes*. J Immunol, 2005. **174**(6): p. 3695-702.
142. Pennino, D., P.K. Bhavsar, R. Effner, S. Avitabile, P. Venn, M. Quaranta, V. Marzaioli, L. Cifuentes, S.R. Durham, A. Cavani, K. Eyerich, K.F. Chung, C.B. Schmidt-Weber, and S. Eyerich, *IL-22 suppresses IFN-gamma-mediated lung inflammation in asthmatic patients*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **131**(2): p. 562-70.
143. Chedid, A., C.L. Mendenhall, T.E. Moritz, S.W. French, T.S. Chen, T.R. Morgan, G.A. Roselle, B.A. Nemchausky, C.H. Tamburro, E.R. Schiff., *Cell-mediated hepatic injury in alcoholic liver disease. Veterans Affairs Cooperative Study Group 275*. Gastroenterology, 1993. **105**(1): p. 254-66.
144. Albano, E. and M. Vidali, *Immune mechanisms in alcoholic liver disease*. Genes Nutr, 2010. **5**(2): p. 141-7.
145. Song, K., R.A. Coleman, C. Alber, Z.K. Ballas, T.J. Waldschmidt, F. Mortari, D.R. LaBrecque, and R.T. Cook, *TH1 cytokine response of CD57+ T-cell subsets in healthy controls and patients with alcoholic liver disease*. Alcohol, 2001. **24**(3): p. 155-67.
146. Song, K., R.A. Coleman, X. Zhu, C. Alber, Z.K. Ballas, T.J. Waldschmidt, and R.T. Cook, *Chronic ethanol consumption by mice results in activated splenic T cells*. J Leukoc Biol, 2002. **72**(6): p. 1109-16.
147. Laso, F.J., C. Iglesias-Osma, J. Ciudad, A. Lopez, I. Pastor, E. Torres, and A. Orfao, *Alcoholic liver cirrhosis is associated with a decreased expression of the CD28 costimulatory molecule, a lower ability of T cells to bind exogenous IL-2, and increased soluble CD8 levels*. Cytometry, 2000. **42**(5): p. 290-5.
148. Steel, J.C., T.A. Waldmann, and J.C. Morris, *Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer*. Trends Pharmacol Sci, 2012. **33**(1): p. 35-41.
149. Durum, S.K. and R.I. Mazzucchelli, *Live from the liver: hepatocyte IL-7*. Immunity, 2009. **30**(3): p. 320-1.

150. Yao, X., J. Huang, H. Zhong, N. Shen, R. Faggioni, M. Fung, and Y. Yao, *Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers*. *Pharmacol Ther*, 2014. **141**(2): p. 125-39.
151. Suzuki, A., S. McCall, S.S. Choi, J.K. Sicklick, J. Huang, Y. Qi, M. Zdanowicz, T. Camp, Y.X. Li, and A.M. Diehl, *Interleukin-15 increases hepatic regenerative activity*. *J Hepatol*, 2006. **45**(3): p. 410-8.
152. Sawa, Y., Y. Arima, H. Ogura, C. Kitabayashi, J.J. Jiang, T. Fukushima, D. Kamimura, T. Hirano, and M. Murakami, *Hepatic interleukin-7 expression regulates T cell responses*. *Immunity*, 2009. **30**(3): p. 447-57.
153. Heinrich, P.C., I. Behrmann, S. Haan, H.M. Hermanns, G. Muller-Newen, and F. Schaper, *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*. *Biochem J*, 2003. **374**(Pt 1): p. 1-20.
154. Hassan, M., D. Selimovic, H. Ghazlan, and O. Abdel-Kader, *Induction of high-molecular-weight (HMW) tumor necrosis factor(TNF) alpha by hepatitis C virus (HCV) non-structural protein 3 (NS3) in liver cells is AP-1 and NF-kappaB-dependent activation*. *Cell Signal*, 2007. **19**(2): p. 301-11.
155. Schirren, C.A., M.C. Jung, J.T. Gerlach, T. Worzfeld, G. Baretton, M. Mamin, N. Hubert Gruener, M. Houghton, and G.R. Pape, *Liver-derived hepatitis C virus (HCV)-specific CD4(+) T cells recognize multiple HCV epitopes and produce interferon gamma*. *Hepatology*, 2000. **32**(3): p. 597-603.
156. Rutz, S., C. Eidenschenk, and W. Ouyang, *IL-22, not simply a Th17 cytokine*. *Immunol Rev*, 2013. **252**(1): p. 116-32.
157. Wolk, K., S. Kunz, E. Witte, M. Friedrich, K. Asadullah, and R. Sabat, *IL-22 increases the innate immunity of tissues*. *Immunity*, 2004. **21**(2): p. 241-54.
158. Xie, M.H., S. Aggarwal, W.H. Ho, J. Foster, Z. Zhang, J. Stinson, W.I. Wood, A.D. Goddard, and A.L. Gurney, *Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(40): p. 31335-9.
159. Borchers, A.T., S. Shimoda, C. Bowlus, C.L. Keen, and M.E. Gershwin, *Lymphocyte recruitment and homing to the liver in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis*. *Semin Immunopathol*, 2009. **31**(3): p. 309-22.
160. Gao, B., *Hepatoprotective and anti-inflammatory cytokines in alcoholic liver disease*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2012. **27 Suppl 2**: p. 89-93.
161. Kawaratani, H., T. Tsujimoto, A. Douhara, H. Takaya, K. Moriya, T. Namisaki, R. Noguchi, H. Yoshiji, M. Fujimoto, and H. Fukui, *The effect of inflammatory cytokines in alcoholic liver disease*. *Mediators Inflamm*, 2013. **2013**: p. 495156.
162. Stoy, S., T.D. Sandahl, A.K. Dige, J. Agnholt, T.K. Rasmussen, H. Gronbaek, B. Deleuran, and H. Vilstrup, *Highest frequencies of interleukin-22-producing T helper cells in alcoholic hepatitis patients with a favourable short-term course*. *PLoS One*, 2013. **8**(1): p. e55101.
163. Lai, Y., A. Di Nardo, T. Nakatsuji, A. Leichtle, Y. Yang, A.L. Cogen, Z.R. Wu, L.V. Hooper, R.R. Schmidt, S. von Aulock, K.A. Radek, C.M. Huang, A.F. Ryan, and R.L. Gallo, *Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3-dependent inflammation after skin injury*. *Nat Med*, 2009. **15**(12): p. 1377-82.
164. Zhang, Y., M.A. Cobleigh, J.Q. Lian, C.X. Huang, C.J. Booth, X.F. Bai, and M.D. Robek, *A proinflammatory role for interleukin-22 in the immune response to hepatitis B virus*. *Gastroenterology*, 2011. **141**(5): p. 1897-906.
165. Lejeune, D., L. Dumoutier, S. Constantinescu, W. Kruijer, J.J. Schuringa, and J.C. Renauld, *Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(37): p. 33676-82.

166. Pan, H., F. Hong, S. Radaeva, and B. Gao, *Hydrodynamic gene delivery of interleukin-22 protects the mouse liver from concanavalin A-, carbon tetrachloride-, and Fas ligand-induced injury via activation of STAT3*. *Cell Mol Immunol*, 2004. **1**(1): p. 43-9.
167. Andoh, A., Z. Zhang, O. Inatomi, S. Fujino, Y. Deguchi, Y. Araki, T. Tsujikawa, K. Kitoh, S. Kim-Mitsuyama, A. Takayanagi, N. Shimizu, and Y. Fujiyama, *Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts*. *Gastroenterology*, 2005. **129**(3): p. 969-84.
168. Zheng, Y., P.A. Valdez, D.M. Danilenko, Y. Hu, S.M. Sa, Q. Gong, A.R. Abbas, Z. Modrusan, N. Ghilardi, F.J. de Sauvage, and W. Ouyang, *Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens*. *Nat Med*, 2008. **14**(3): p. 282-9.
169. Zheng, Y., D.M. Danilenko, P. Valdez, I. Kasman, J. Eastham-Anderson, J. Wu, and W. Ouyang, *Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis*. *Nature*, 2007. **445**(7128): p. 648-51.
170. Radaeva, S., R. Sun, H.N. Pan, F. Hong, and B. Gao, *Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation*. *Hepatology*, 2004. **39**(5): p. 1332-42.
171. Zenewicz, L.A., G.D. Yancopoulos, D.M. Valenzuela, A.J. Murphy, M. Karow, and R.A. Flavell, *Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation*. *Immunity*, 2007. **27**(4): p. 647-59.
172. Park, O., H. Wang, H. Weng, L. Feigenbaum, H. Li, S. Yin, S.H. Ki, S.H. Yoo, S. Dooley, F.S. Wang, H.A. Young, and B. Gao, *In vivo consequences of liver-specific interleukin-22 expression in mice: Implications for human liver disease progression*. *Hepatology*, 2011. **54**(1): p. 252-61.
173. Jiang, R., Z. Tan, L. Deng, Y. Chen, Y. Xia, Y. Gao, X. Wang, and B. Sun, *Interleukin-22 promotes human hepatocellular carcinoma by activation of STAT3*. *Hepatology*, 2011. **54**(3): p. 900-9.
174. Ki, S.H., O. Park, M. Zheng, O. Morales-Ibanez, J.K. Kolls, R. Bataller, and B. Gao, *Interleukin-22 treatment ameliorates alcoholic liver injury in a murine model of chronic-binge ethanol feeding: role of signal transducer and activator of transcription 3*. *Hepatology*, 2010. **52**(4): p. 1291-300.
175. Kong, X., D. Feng, H. Wang, F. Hong, A. Bertola, F.S. Wang, and B. Gao, *Interleukin-22 induces hepatic stellate cell senescence and restricts liver fibrosis in mice*. *Hepatology*, 2012. **56**(3): p. 1150-9.
176. Meng, F., K. Wang, T. Aoyama, S.I. Grivennikov, Y. Paik, D. Scholten, M. Cong, K. Iwaisako, X. Liu, M. Zhang, C.H. Osterreicher, F. Stickel, K. Ley, D.A. Brenner, and T. Kisseleva, *Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice*. *Gastroenterology*, 2012. **143**(3): p. 765-76.e1-3.
177. Xiang, X., H. Gui, N.J. King, L. Cole, H. Wang, Q. Xie, and S. Bao, *IL-22 and non-ELR-CXC chemokine expression in chronic hepatitis B virus-infected liver*. *Immunol Cell Biol*, 2012. **90**(6): p. 611-9.
178. Hernandez-Gea, V. and S.L. Friedman, *Pathogenesis of liver fibrosis*. *Annu Rev Pathol*, 2011. **6**: p. 425-56.

Dank

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person. Deshalb ist es jetzt an der Zeit, mich bei allen Menschen zu bedanken, die mir die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht haben.

Im ganz besonderen Maße danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Kilian Eyerich und Frau Dr. Stefanie Eyerich für die Ermöglichung dieser Arbeit, die hervorragende freundschaftliche Betreuung und ihre ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft, die auch durch die Geburt von zwei Kindern nicht gemindert wurde. Für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich überdies noch recht herzlich bei Dr. Stefanie Eyerich bedanken.

Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern des ZAUM, die mir stets Ansprechpartner waren und mein Forschungsprojekt durch ihre Ideen, ihre Anregungen und ihre konstruktive Kritik bereicherten.

Schließlich danke ich in ganz besonderer Weise meinen Eltern für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während meines Studiums, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.