

Charakterisierung und Therapie der experimentellen Cholangitis im Mausmodell

Dissertationsschrift zur Erlangung
des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat)

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

vorgelegt von

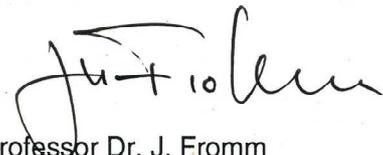
Dorothee Schwinge

aus Ilbenstadt

Hamburg, September 2011

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Priv.-Doz. Dr. J. HERKEL
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Prof. Dr. T. DOBNER
Tag der Disputation: 09. September 2011

Hamburg, den 25. August 2011

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Fromm', is written over the printed name.

Professor Dr. J. Fromm
Vorsitzender des Promotionsausschusses
Biologie

*In liebevoller Erinnerung meinen Großvätern
Christian Becker und Horst Schwinge
gewidmet*

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	7
1.1 Autoimmune Lebererkrankungen.....	7
1.1.1 Autoimmune Hepatitis (AIH).....	7
1.1.2 Primär Biliäre Zirrhose (PBC).....	8
1.1.3 Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC)	9
1.1.4 Tiermodelle	11
1.1.4.1 Tiermodelle der PBC	11
1.1.4.2 Tiermodell einer antigenspezifischen portalen Entzündung.....	11
1.1.4.3 Tiermodelle der PSC	12
1.1.5 Regulatorische T Zellen	13
1.1.5.1 Natürlich vorkommende regulatorische T Zellen.....	13
1.1.5.2 Induzierte regulatorische T Zellen.....	14
1.1.6 <i>In Vitro</i> Konversion von regulatorischen Zellen	16
1.1.7 Suppressionsmechanismen	17
1.1.8 Regulatorische T Zellen und Leber	18
1.1.9 Regulatorische T Zellen und autoimmune Lebererkrankungen.....	18
1.1.10 Regulatorische Zellen als Therapeutikum	19
1.1.11 Zielsetzung.....	20
2. Material und Methoden.....	22
2.1 Material	22
2.1.1 Geräte	22
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	22
2.1.3 Immunhistochemie	24
2.1.4 Kits	24
2.1.5 Antikörper Durchflusszytometrie	24
2.1.6 Puffer.....	25
2.2 Methoden.....	26
2.2.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung.....	26
2.2.1.1 Zucht und Erhaltung transgener Mauslinien	26
2.2.1.2 Isolierung genomischer DNA aus Gewebe	26
2.2.1.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)	27
2.2.1.4 DNA Elektrophorese	27
2.2.2 Isolierung von Primärzellen aus der Milz.....	27
2.2.2.1 Isolation von CD4+ CD25- T Lymphozyten aus der Milz	28
2.2.2.2 Isolation von CD4+CD25+ T Lymphozyten aus der Milz	29
2.2.2.3 Isolation von CD4+CD25+ T Lymphozyten aus der Milz mittels Zellsorter.....	29
2.2.2.4 Isolation von CD8+ T Lymphozyten aus der Milz.....	30
2.2.2.5 Isolierung von Leberlymphozyten	30
2.2.3 Zellkulturmedium	31
2.2.4 Konversion von CD4+CD25- T Lymphozyten.....	31
2.2.5 Restimulation von Zellen für die Detektion von Zytokinen.....	31
2.2.6 Zellzählung.....	31
2.2.7 Zellcharakterisierung	32
2.2.7.1 Vitalitätstest	32
2.2.7.2 Proliferation.....	32
2.2.8 Durchflusszytometrie.....	33
2.2.8.1 Färbung von Oberflächenmarkern	33

2.2.8.2 Intrazelluläre Zytokinfärbung.....	33
2.2.8.3 Färbung von regulatorischen T Zellen	33
2.2.8.4 Durchflusszytometrie	34
2.2.9 Zytokinbestimmung im Zellkulturüberstand	34
2.2.10 Immunhistochemie (IHC).....	35
2.2.10.1 Organpräparation.....	35
2.2.10.2 Herstellung der Schnitte	35
2.2.10.3 Hämatoxylin-Eosin Färbung	35
2.2.10.4 Sirius Red Färbung.....	35
2.2.10.5 Foxp3/CD3 Färbung	36
2.2.10.6 Mikroskopische Zellzahlbestimmung	36
2.2.10.7 Modifizierter histologischer Aktivitätsindex (mHAI)	36
2.2.11 Tierversuche	37
2.2.11.1 Bestimmung von Serumtransaminasen	37
2.2.11.2 Bestimmung von Antimitochondrialen Antikörpern im Blutserum.	37
2.2.11.3 K14Ovap Mausmodell der Primär Biliären Zirrhose.....	37
2.2.11.4 Orchiektomie.....	38
2.2.11.5 Hormonpelletimplantation	38
2.2.11.6 Transfer regulatorischer T Zellen.....	39
2.2.11.7 Induktion eines chronischen Gallengangsschadens/Cholangitis durch DDC Fütterung.....	39
2.2.11.8 Rapamycingabe.....	39
2.2.12 Statistische Analysen	40
3. Ergebnisse	41
3.1 Etablierung einer portalen antigenabhängigen Entzündung im K14OVAp Mausmodell	41
3.1.1 Rekrutierung der transferierten Zellen.....	46
3.1.2 Regulatorische T Zellfunktionen	48
3.1.3 T Zell Effektorfunktionen	50
3.1.4 Einfluss der Sexualhormone auf die portale Entzündung in K14OVAp Tieren.....	54
3.1.5 Einfluss von Sexualhormonen auf regulatorische T Zellfunktionen	57
3.1.6 Einfluss von Sexualhormonen auf T Zelleffektorfunktionen.....	59
3.2 MDR2-/- Mausmodell einer primär nicht autoimmun bedingten portalen Entzündung.....	63
3.3 Wiederherstellung der immunologischen Toleranz in der Leber durch den Transfer von regulatorischen T Zellen (Treg) im MDR2-/- Modell einer primär nicht autoimmun bedingten Leberentzündung.....	66
3.3.1 Treg Transferversuche in einem Mausmodell einer Antigen-abhängigen portalen Leberentzündung	75
3.4 Konversion von CD4+CD25-Foxp3- T Zellen	78
3.4.1 Steigerung der Konversionsrate.....	80
3.4.2 Stabilität der Foxp3 Expression nach Konversion	85
4. Diskussion	88
4.1 Etablierung einer portalen Antigen-abhängigen Entzündung im K14OVAp Mausmodell	88
4.2 Wiederherstellung der immunologischen Toleranz in der Leber durch den Transfer von regulatorischen T Zellen (Treg).....	95
4.3 Weiterentwicklung der <i>in vitro</i> Konversion von CD4+CD25- T Zellen zu stabilen iTreg	98
5. Ausblick.....	101

a) Mausmodelle portaler Entzündungen	101
b) Treg Transfer	102
c) <i>In vitro</i> Konversion	102
6. Zusammenfassung	104
7. Referenzen	106
8. Abkürzungsverzeichnis	118
9. Kongressbeiträge	120
10. Danksagung	121

1. Einleitung

1.1 Autoimmune Lebererkrankungen

Unter dem Begriff *autoimmune Lebererkrankungen* werden die Krankheitsbilder autoimmune Hepatitis (AIH), Primär biliäre Zirrhose (PBC) und Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC) zusammengefasst. Die Erkrankungen unterscheiden sich in Ausprägung und Verlauf, haben jedoch gemeinsam, dass das eigene Immunsystem die Leber angreift. Die Therapie dieser Erkrankungen ist unspezifisch und häufig unzureichend wirksam. Fast 20% aller Lebertransplantationen in Europa werden aufgrund autoimmuner Lebererkrankungen durchgeführt.

1.1.1 Autoimmune Hepatitis (AIH)

Die Autoimmune Hepatitis ist eine seltene Erkrankung. Die Prävalenz der Erkrankung liegt in Nordeuropa bei 170 Fällen pro 1 Million [1]. Frauen erkranken häufiger als Männer, wobei die Erkrankungsrate Männer: Frauen bei 4:1 Fällen liegt. Die AIH ist assoziiert mit den Leukozytenantigenen HLA A1 B8 DR2 und HLA DR4. Die betroffenen Patienten weisen erhöhte γ -Globuline (>30 g/l), hohe Serumtransaminasen und zirkulierende Antikörper gegen Gewebsantigene auf [2]. Das Vorkommen unterschiedlicher Autoantikörper ist eines der charakteristischsten Merkmale der AIH. So führte das Autoantikörpervorkommen zur Klassifizierung der AIH in drei verschiedene Subtypen (AIH1-3) [3]. Entsprechend der Nomenklatur ist somit die AIH Typ 1 charakterisiert durch anti-nukleäre und/oder anti-smooth muscle Autoantikörper [4]. Die AIH Typ 2 ist durch Antikörper spezifisch für Leber und Nieren Mikrosomen (LKM) charakterisiert [5] und die AIH Typ 3 durch Autoantikörper gegen ein lösliches Leberantigen im Cytosol (SLA) [6] bzw. Antikörper gegen das Leber-Pankreas Antigen (anti-LP) [7]. Patienten mit einer schweren AIH können effektiv durch eine adäquate immunsuppressive Therapie behandelt werden. Ohne Behandlung ist die Prognose schlecht [2, 8]. Demnach weisen unbehandelte Patienten, mit biochemischen oder histologischen Indikatoren für eine schwere AIH, wie z.B. hohe ALT Werte, Hypergammaglobulinämie und multilobuläre Nekrose, eine 50%ige Mortalität innerhalb von 5 Jahren und eine 90%ige Mortalität innerhalb von 10 Jahren auf [9].

1.1.2 Primär Biliäre Zirrhose (PBC)

Die Primär Biliäre Zirrhose wird aufgrund ihres homogenen Phänotyps bei Patienten als typische autoimmune Erkrankung eingestuft. Die häufigsten Symptome sind Erschöpfung und Juckreiz [10]. Die PBC ist eine chronisch verlaufende Erkrankung, die sich durch die Zerstörung der kleinen intrahepatischen Gallengänge auszeichnet. Progressive Zerstörung der Gallengänge führt zu Fibrose, Cholestase, bis hin zur Leberzirrhose [11, 12]. Sie ist charakterisiert durch den spezifischen Toleranzverlust gegen ein ubiquitär exprimiertes, mitochondrielles Antigen, die E2 Komponente des Pyruvat Dehydrogenase Komplexes (PDC-E2) [13, 14]. Rekombinante Autoantigene des PDC-E2 werden zur Antikörper-Diagnostik eingesetzt. Die Anti-mitochondrialen Antikörper (AMAs) sind ein Kriterium zur Krankheitsdiagnose oder zeigen ein erhebliches Risiko an, innerhalb der kommenden 10-15 Jahre an PBC zu erkranken [15]. Die Anwesenheit von Autoantikörpern ist zudem begleitet von einem Anstieg an hepatischen, antigen-spezifischen CD4+ T Zellen und einem Anstieg an antigen-spezifischen CD8+ T Zellen. Die autoreaktiven CD8+ T Zellen zerstören spezifisch PDC-E2 exprimierende Zellen und produzieren mehr IFN γ , als die antiinflammatorischen Zytokine IL4 und IL10 [16]. Frauen sind etwa 10-mal häufiger betroffen als Männer, der Verlauf der Erkrankung ist jedoch identisch [12]. Etwa 0,1% der Frauen, älter als 40 Jahre, erkranken an PBC [17]. Verwandtschaft ersten Grades, Rauchen oder die Verwendung von Hormonersatztherapien können das PBC Erkrankungsrisiko steigern [17, 18]. Etwa 33% der Patienten entwickeln im Verlauf weitere autoimmune Erkrankungen, wie z.B. Sklerodermie oder Sjögren Syndrom, ebenso wie Cholestase oder Puritus im Verlauf einer Schwangerschaft [17, 19, 20].

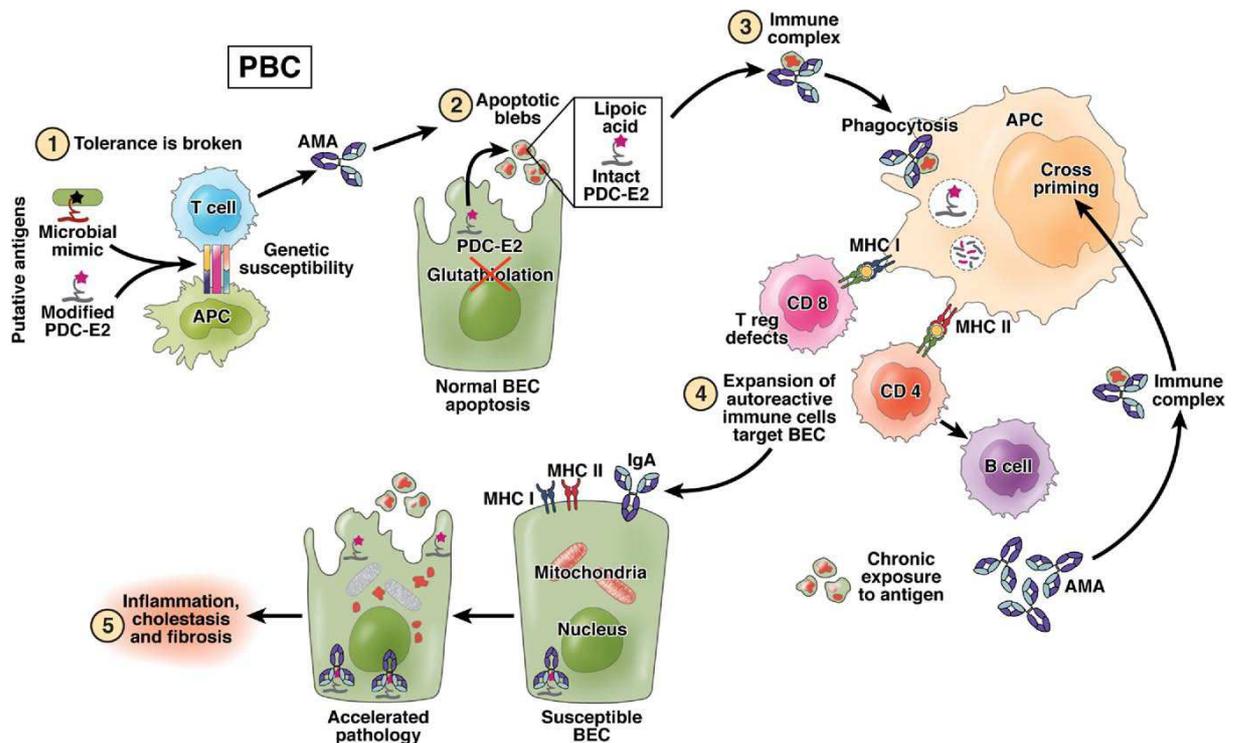


Abb.1) Erkrankungsmodell der PBC. Das mitochondriale PDC-E2 Antigen wird Immunzellen präsentiert. Die entstehenden Immunkomplexe führen zur Expansion autoreaktiver Immunzellen, welche die biliären Epithelzellen angreifen und dadurch chronische Entzündung, Cholestase und Fibrose verursachen. Genetische Komponenten und Umweltfaktoren können das Risiko für die Erkrankung erhöhen (Hirschfield et al, Gastroenterology 2010 [21])

1.1.3 Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC)

Die Primär Sklerosierende Cholangitis ist eine chronisch verlaufende cholestatische Lebererkrankung, welche charakterisiert ist durch konzentrische und obliterative Fibrose der intra- und/oder extrahepatischen Gallengänge und eine lymphozytäre Entzündung des Portalen Traktes. Dies führt zu Cholestase und Zirrhose [22]. So zeigt sich histologisch eine konzentrische periduktuale Fibrose (Onion skin), was zur Stenose der kleineren Gallengänge führt. Die infiltrierenden Leberlymphozyten bei PSC Patienten sind hauptsächlich CD4+ Th1 Zellen (Portales Infiltrat) und CD8+ T Zellen (lobuläres Infiltrat). Auch der Anteil an $\gamma\delta$ + T Zellen ist in PSC Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht [21, 23]. Bei 75-90% der PSC Patienten verläuft die Erkrankung in Verbindung mit einer entzündlichen Darmerkrankung, vorwiegend der Colitis Ulcerosa (CU), welche

jedoch auch zeitlich unabhängig auftreten kann [22, 24]. Auch wenn die Erkrankung bei Kindern und Erwachsenen jeden Alters auftreten kann, so liegt das mittlere Erkrankungsalter bei etwa 42 Jahren. Männer sind zweimal häufiger betroffen als Frauen, was einen entscheidenden Unterschied zur Erkrankungsrate bei AIH und PBC Patienten darstellt [25, 26]. Der Verlauf der Erkrankung ist sehr variabel. Im Durchschnitt liegen vom Zeitpunkt der Diagnose bis zur Lebertransplantation oder Tod 12 bis 15 Jahre. Zudem entwickeln etwa 10-15% der PSC Patienten in Assoziation mit Fibrose ein Cholangiokarzinom [24].

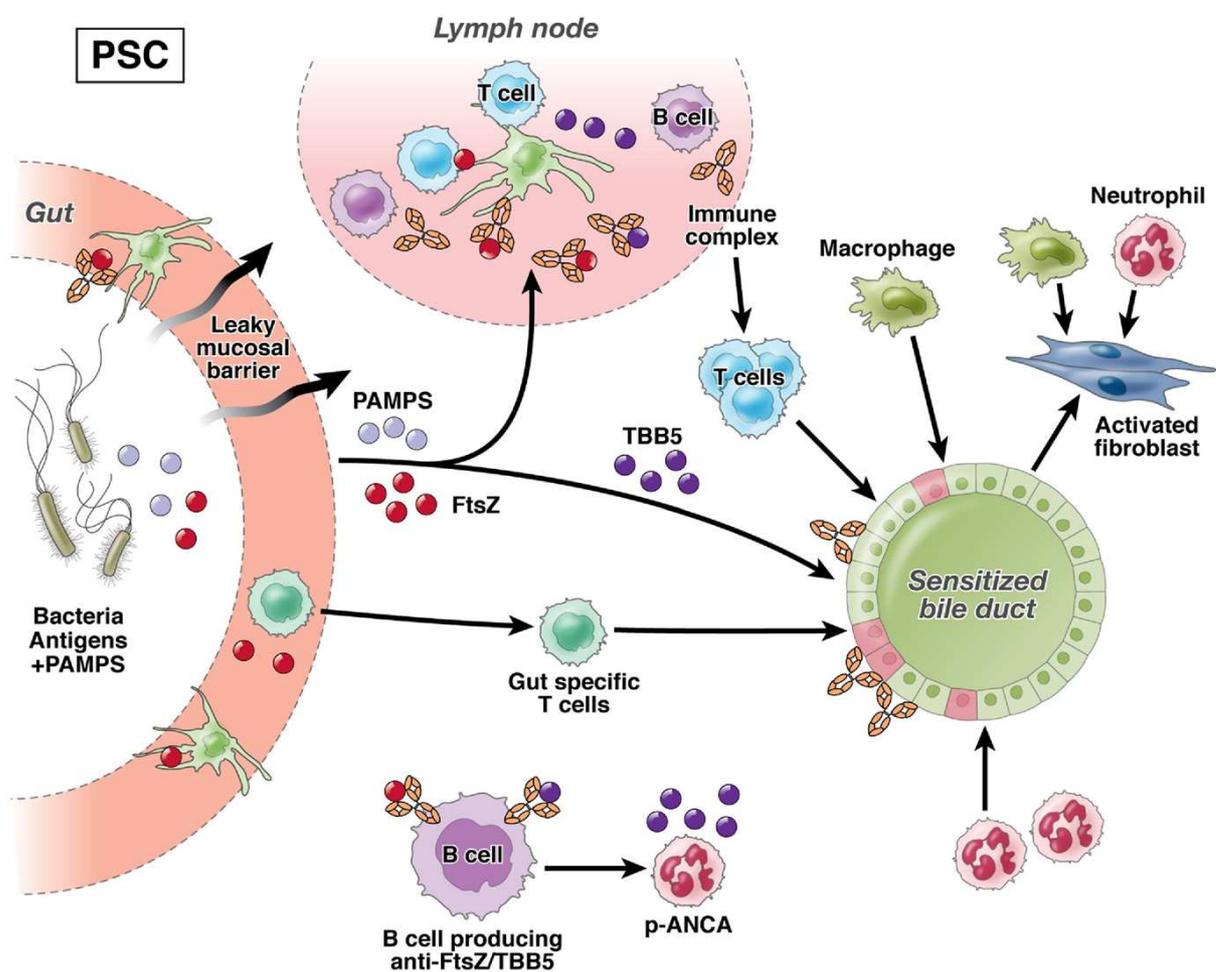


Abb.2) Erkrankungsmodell der PSC. Immunzellen werden im Gastrointestinalen Trakt und Lymphknoten aktiviert und beschädigen sensibilisierte Gallengänge. (Hirschfield et al, Gastroenterology 2010 [21])

1.1.4 Tiermodelle

1.1.4.1 Tiermodelle der PBC

Für die PBC wurden einige sich spontan entwickelnde PBC Modelle beschrieben. Die NOD.c3c4 Maus zeigt histopathologisch biliäre Lymphozyteninfiltrate, Granulome und ist zu 50-60% positiv für Autoantikörper (AMAs). Zudem zeigt sich eine fortschreitende biliäre Obstruktion [27]. Es ist möglich, die Erkrankung durch Transfer von Splenozyten in naiven Mäusen zu induzieren, was für einen autoimmunen Ursprung spricht [28]. Eine dominant negative TGF β Rezeptor II (dnTGF β RII) Maus weist ebenfalls spontan Charakteristika der PBC auf. So kommt es zur spontanen Produktion von AMAs gegen die PDC-E2 Untereinheit und lymphozytärer periportal Entzündung [29]. Die IL-2R α ^{-/-} Maus weist histologisch portale Entzündungen und Gallengangsschädigungen vergleichbar mit humanen PBC Patienten auf. Zudem produzieren die Mäuse AMAs gegen die PDC-E2 Untereinheit [30]. Die Ae2_{a,b}^{-/-} Maus weist ebenfalls immunologisch, biochemisch und hepatobiliär morphologische Eigenschaften der PBC auf. So kommt es zu signifikant reduzierten CD4⁺/CD8⁺ Ratios aufgrund einer Expansion von CD8⁺ Zellen und einer reduzierten Anzahl an regulatorischen T Zellen. Zudem entwickeln sich erhöhte Serumtiter an IgG, IgM und AMA [31].

Alle beschriebenen sich spontan entwickelnden Mausmodelle weisen Eigenschaften, ähnlich zum Krankheitsbild bei humanen Patienten auf, wie lymphozytäre Entzündung, AMAs gegen PDC-E2 Untereinheit, verminderte CD4/CD8 Ratio in der Leber und erhöhte IFN- γ und TNF α Spiegel. Die Immunpathologie in allen Mausmodellen verläuft jedoch gleich zwischen männlichen und weiblichen Tieren, was der überwiegend weiblichen Erkrankungsrate beim Menschen widerspricht [32].

1.1.4.2 Tiermodell einer antigenspezifischen portalen Entzündung

Als Modell einer antigenspezifischen Entzündung wurde die K14OVAp Maus beschrieben [33]. Die K14OVAp transgene Mäuse exprimieren unter der Kontrolle des humanen Keratinpromoters (K14) eine MHC Klasse I restringierte Ovalbumin (OVA)- SIINFEKL Peptidsequenz (Aminosäuren 257-264) auf ihren Epithelzellen. Neben der Expression im Ösophagus, der Haut und der Zunge kann die OVA Expression auch auf Gallengangsepithelzellen nachgewiesen werden. Die Kreuzung von K14OVAp Mäusen mit OT-1 transgenen Mäusen, deren CD8⁺ T Zellen einen OVAp-spezifischen T Zellrezeptor tragen, führt zur Letalität der doppeltransgenen Tiere in einem Alter von 2 bis 6 Wochen. Die Tiere weisen inflammatorische Infiltrate in der Haut und dem Ösophagus,

sowie eine portale Entzündung auf [34]. Neben den doppeltransgenen Tieren mit letalem Verlauf gibt es die Möglichkeit, über Zelltransfer eine Entzündung in K14OVAp Empfängertieren zu induzieren. So verursacht der Transfer naiver OT1-CD8+ T Zellen in K14OVAp Tieren eine chronische Hauterkrankung [35].

1.1.4.3 Tiermodelle der PSC

Bis heute wurde noch kein Tiermodell entwickelt, welches alle Charakteristika der PSC widerspiegelt [36, 37]. Durch induzierbare Colitis Modelle versucht man den engen Zusammenhang zwischen inflammatorische Darmerkrankung (IBD) und PSC zu identifizieren. So kommt es z.B. bei einer mit Dextran Sulfat Natrium (DSS) induzierten Colitis in CD-1 Mäusen zu Zellinfiltraten um den Gallengang und fokaler Nekrose. Die Cholangitis entwickelt sich in diesem Modell erst nach Ausbruch der Colitis [38]. Bereits vor den histologischen Veränderungen in der Leber kommt es zu einer erhöhten CD4+/CD8+ Ratio der Leberlymphozyten. Eine Analyse der mononukleären Zellen zeigte erhöhte Mengen an IFN- γ im Vergleich zu IL-4 und IL-10. Im Verlauf weist das Modell jedoch keine Gallengangsschädigungen oder Fibrose auf [39]. Im MDR2-/- Mausmodell kommt es zu einer gezielten Unterbrechung des *MDR2 (Abcb4)* Gens, welches für die kanalikuläre Phospholipid Flipase kodiert. Biliäre Phospholipide werden über die kanalikuläre Phospholipid Flipase Mdr2 in die Galle transportiert, um dort Micellen aus Phospholipiden und Gallensäure zu bilden. Diese Micellen schützen die Cholangiozyten vor Schädigung durch Gallensäure. Durch den Ausfall der Transportpumpen sind die biliären Phospholipide in der Galle der MDR2-/- Mäusen nicht vorhanden und es kommt es zu einer durch Gallensäure induzierten Schädigung. Die Tiere entwickeln spontan eine sklerosierende Cholangitis mit makroskopischen und mikroskopischen Eigenschaften der humanen PSC, wie extra- und intrahepatischen biliären Stenosen, konzentrischer periduktualer Fibrose und fokaler Obliteration der Gallengänge [40-42]. Ein toxisch induzierbares Modell einer Gallengangsschädigung und biliärer Fibrose stellt die Fütterung mit 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydroxycholesterin (DDC) dar. DDC Fütterung führt zu erhöhter Porphyrinsekretion, Induktion von VCAM und TNF- α Expression. Dies führt zu einer Pericholangitis mit signifikant erhöhter Anzahl an CD11b- positiven Zellen, dukturalen Veränderungen und Aktivierung von Myofibroblasten, was letztendlich zur biliären Fibrose führt [43]

1.1.5 Regulatorische T Zellen

Jeder physiologische Prozess muss kontrolliert und nach Beendigung seiner Aufgaben beendet werden. Ohne Regulierung der physiologischen Prozesse, besteht die Gefahr der pathologischen Entartung. Dies passiert im Besonderen bei immunologischen Reaktionen, wo Kontrolle und Regulierung der Prozesse Immunantworten beenden [44].

1.1.5.1 Natürlich vorkommende regulatorische T Zellen

Im Jahr 1995 beschrieb Sakaguchi et al. eine neue Untereinheit von CD4+ T Zellen, welche konstitutiv die IL-2 Rezeptor R alpha (α) Kette (CD25) exprimieren. Diese natürlich vorkommenden CD4+CD25+ T Zellen machen etwa 5-10% aller T- Helferzellen (Th) aus und weisen starke immunsuppressive Funktionen *in vitro* und *in vivo* auf [45]. So induzierte die Injektion von CD4+CD25- T Zellen in immundefiziente Mäuse eine Colitis, wohingegen eine gleichzeitige Injektion von CD4+CD25- T Zellen zusammen mit CD4+CD25+ T Zellen die Darmentzündung verhindern konnten. Zudem sind murine CD4+CD25+ T Zellen *in vitro* in der Lage, die Proliferation von CD4+CD25- und CD8+ T Zellen zu unterdrücken [46]. Dass die Entstehung autoimmuner Erkrankungen direkt durch Dysfunktion von nTreg Zellen verursacht werden kann, konnte durch die physikalische Depletion oder funktionale Hemmung der nTreg Zellen in gesunden Mäusen gezeigt werden. Hier führte der nTreg Ausfall zur spontanen Entwicklung verschiedener autoimmuner Erkrankungen, wie Gastritis, Thyreoiditis, Orchitis, Oophoritis, Typ I Diabetes und inflammatorischer Darmerkrankung (IBD). Die so induzierten Erkrankungen konnten durch den Transfer von CD4+CD25+ T Zellen verhindert werden [47-49].

Die Oberflächenmarker CD4+ und CD25+ sind für die Charakterisierung von nTreg Zellen nicht ausreichend. So wird CD25, aufgrund muriner Th Zellaktivierung, transient exprimiert und die Expression ist sehr dynamisch [50]. Zudem ist die CD4+ CD25+ T Zellpopulation sehr heterogen und nur ein Teil dieser Zellen weist regulatorische/suppressive Kapazitäten auf, insbesondere die CD4+ CD25^{high} exprimierende Zellen. Mittlerweile sind weitere Oberflächenmoleküle beschrieben worden, welche mit humanen und/oder murinen Treg Zellen assoziiert werden, so z.B. das intrazelluläre zytotoxische T-Lymphozyten aktivierenden Antigen (CTLA4; CD152) [51, 52], Neuropilin-1 (Nrp-1) [53], glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related gene (GITR) [54], Chemokinerezeptoren CCR4 und CCR8 [55], CD62L (L-Selectin) [52], Lymphozyten Aktivierungsgen-3 (LAG-3) [56] und das Integrin $\alpha_E\beta_7$ (CD103) [57], sowie niedrige Expression von CD45RB [58].

Im Jahr 2003 konnte ein weiterer einzigartiger Marker für Treg Zellen identifiziert werden, der zur forkhead winged helix Familie gehörende, Transkriptionsfaktor Foxp3 [59, 60]. Ein Großteil der peripheren und thymischen Foxp3+ T Zellen in der Maus sind CD4+CD25+ Zellen und eine genetisch bedingte Defizienz von Foxp3 resultiert in Autoimmunerkrankungen [59, 61]. Bei Patienten, die am IPEX- Syndrom (immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked) erkrankt sind, einer Autoimmunerkrankungen der endokrinen Organe, konnte eine Mutation im Foxp3 Gen identifiziert werden [62]. Das murine genetische Äquivalent zum IPEX Syndrom ist die Scurfy (sf) Maus. Die Mutation des Foxp3 Gens in diesen Mäusen resultiert in einem Verlust von Foxp3 Protein und nTreg Zellen, sowie einer schnellen lymphoproliferativen Störung, welche charakterisiert ist durch exzessive Proliferation von CD4+ T Zellen und Multiorganinfiltrationen [63]. Die Generierung der natürlich vorkommenden Treg findet vermutlich im Thymus statt, da die Thymektomie 3 Tage alter Mäuse in einem Verlust von peripheren CD4+CD25+ T Zellen resultiert [64]. Die Visualisierung und Lokalisation der initialen Foxp3 Expression innerhalb des Thymus wurde erheblich erleichtert durch die Generierung von Foxp3-green fluorescent protein (GFP) Reporter Mäusen [65]. Mit Hilfe dieser Mäuse konnte gezeigt werden, dass die Foxp3 Expression hauptsächlich im CD4 einzelpositiven Stadium der Entwicklung induziert wird. Ein kleiner Anteil an Foxp3 positiven Zellen konnte jedoch auch im doppelpositiven und CD8 einzelpositiven Entwicklungsstadium von Thymozyten detektiert werden [66].

In welcher Region des Thymus die Foxp3 Expression generiert wird, ist immer noch unklar. So sind sowohl die Medulla, wie auch der Cortex des Thymus als Entstehungsort in der Diskussion [67-70]. Auch nach dem Verlassen des Thymus bewahren sich die entstandenen Treg einen stabilen Phänotyp. In der Peripherie können sie durch spezifische Antigene aktiviert werden und erlangen die phänotypischen Eigenschaften von Effektor Memoryzellen, wie z.B. die Möglichkeit zum entzündeten Gewebe zu migrieren, während sie ihre Foxp3 Expression und ihre suppressive Kapazität aufrecht erhalten [71].

1.1.5.2 Induzierte regulatorische T Zellen

Natürlich vorkommende nTreg werden durch Selektion endogener Eigenpeptide im Thymus generiert. Sie sind hauptsächlich dafür verantwortlich, autoreaktive T Zellen zu kontrollieren. Regulatorische T Zellen können aber auch in der Peripherie aus konventionellen CD4 T Zellen generiert werden. Diese induzierten Treg (iTreg) findet man hauptsächlich im inflammatorischen Milieu, wo es sinnvoll ist, aktivierte T Zellen in suppressive T Zellen zu konvertieren [72]. So ist z.B. die Leber in der Lage konventionelle

CD4 T Zellen zu CD4+CD25+Foxp3+ regulatorischen T Zellen zu konvertieren, wobei die molekularen und zellulären Mechanismen dieser Konversion noch nicht geklärt sind [73]. Bei der peripheren Konversion scheint eine suboptimale Rezeptorstimulation, sowie der Einfluss von TGFβ eine Rolle zu spielen [74]. So induziert eine T Zell-Stimulation in Anwesenheit von TGFβ in naiven CD4 Zellen die Expression von Foxp3. Die Zellen erlangen suppressive Fähigkeiten [75]. Eine gestörte TGFβ Signalfunktion in T Zellen führt zu einer Verringerung der CD4+CD25+ Zellpopulation in der Peripherie, nicht aber im Thymus. Die Foxp3 Expression ist in T Zellen mit gestörter TGFβ Signalfunktion ist vermindert. Eine Überexpression von TGFβ in T Zellen resultiert hingegen in einer vermehrten Anzahl an CD4+CD25+ Zellen im Thymus und der Peripherie. Die TGFβ überexprimierenden Zellen weisen zudem eine erhöhte Foxp3 Expression auf [76]. Der Mechanismus der TGFβ induzierten Transkription von Foxp3 beinhaltet die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT3 und NFAT an einem Foxp3 Gen Enhancer Element [77, 78].

Nicht nur Foxp3 exprimierende iTreg können aus CD4+ T Helferzellen generiert werden. Der Einfluss von IL-6 und TGFβ konvertiert murine CD4+ T Zellen in IL-17 produzierende T Zellen (Th17 Zellen) [79, 80]. TGFβ reguliert hierbei die Expression von RORγt, einem essentiellen Transkriptionsfaktor für die Th17 Differenzierung, hoch. IL-23, welches von immunogenen dendritischen Zellen produziert wird, vervollständigt die Differenzierung der Zellen in proinflammatorische Th17 Zellen [81].

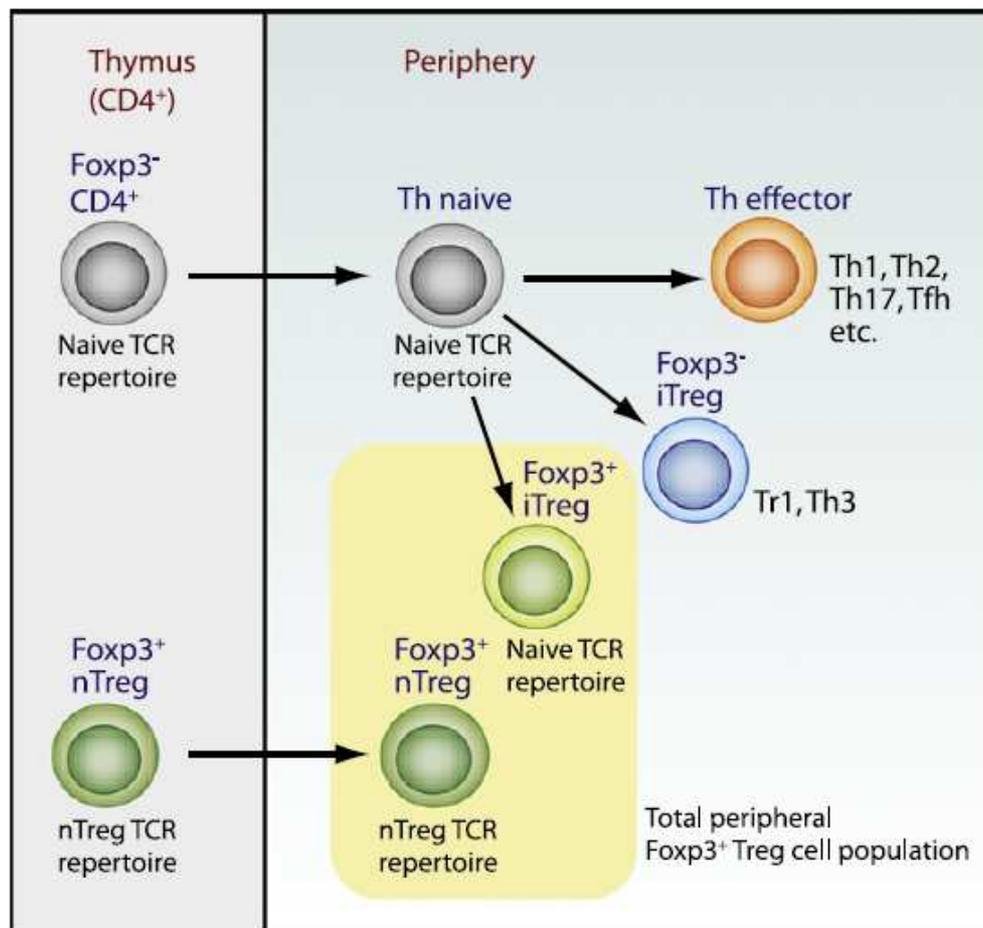


Abb.3) Natürliche Treg (nTreg) differenzieren im Thymus und migrieren in das periphere Gewebe. Adaptive Foxp3⁺ Treg (iTreg) differenzieren im sekundären lymphatischen Gewebe. Die periphere Population der Foxp3⁺ Treg Zellen beinhaltet sowohl nTreg wie auch iTreg Zellen. Es ist denkbar, dass sich nTreg und Foxp3⁺ iTreg Zellen in ihrem TCR Repertoire unterscheiden, da iTreg Zellen sich aus peripheren naiven CD4⁺ Zellen entwickeln (Curotto de Lafaille, Immunity 2009 [82]).

1.1.6 *In Vitro* Konversion von regulatorischen Zellen

Isolierte CD4⁺CD25⁻ T Zellen aus dem peripheren Blut oder lymphatischen Organen können auch *in vitro* zu Foxp3 exprimierenden iTreg Zellen konvertiert werden. Hierfür wird eine suboptimale T Zellrezeptorstimulation und die Anwesenheit von TGFβ und IL-2 benötigt [77, 83]. Dieser Prozess wird gesteigert durch Retinsäure (Vitamin-A Säure) und antagonisiert durch IL-6 und IFNγ. Nach Zugabe von Retinsäure zu CD4⁺ T Zellen zeigt sich eine erhöhte Anzahl der Foxp3 exprimierenden Zellen in der Anwesenheit von TGFβ. Retinsäure scheint dabei der Aktivität von IL-6 Dosis- abhängig entgegenzuwirken [84].

Über die Stabilität des regulatorischen Phänotyps der iTreg herrscht noch Unklarheit. *In vitro* scheinen TGF β induzierte iTreg nach Restimulation rasch ihre Foxp3 Expression zu verlieren [85]. So konnte ein Verlust der Foxp3 Expression nach 4 Tagen in Abwesenheit von TGF β beobachtet werden, ein Effekt, den man bei nTreg nicht feststellen konnte [86]. Auch der adoptive Transfer von *in vitro* konvertierten iTreg in Wildtypmäuse resultierte in einem Verlust der Foxp3 Expression bei einem Großteil der transferierten Zellen innerhalb von 2 Tagen. Die Foxp3- Zellen waren hauptsächlich im Blut, der Milz, der Lunge und der Leber lokalisiert. Allerdings konnten auch einige stabil exprimierende Foxp3+ iTreg nach Transfer nachgewiesen werden. Diese Zellen wurden im Knochenmark und den Lymphknoten bis zu 28 Tage nach Transfer detektiert [87].

Eine mögliche Erklärung für die Instabilität der *in vitro* generierten Treg im Vergleich zu den *in vivo* generierten Zellen liegt im unterschiedlichen Grad der Demethylierung des Foxp3 Locus. DNA Methylierung bewirkt eine epigenetische Modifikation, welche in einer dauerhaften Änderung der Genexpression resultiert [88]. Bei *in vivo* generierten iTreg und bei nTreg ist der Foxp3 Locus wesentlich stärker demethyliert als in *in vitro* konvertierten iTreg [89]. Dies spricht dafür, dass während der *in vivo* Generierung von Treg zusätzliche Signale den Phänotyp stabilisieren.

1.1.7 Suppressionsmechanismen

Der genaue Mechanismus der nTreg Zell vermittelten Suppression ist nicht bekannt [90]. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ nTreg supprimieren die Proliferation und Zytokinantwort von naiven T Zellen, ebenso wie die von Makrophagen, DC-, NK-, NK-T- und B- Zellen, in einer Antigen-unabhängigen Weise [90, 91]. *In vivo* scheint die suppressive Aktivität hauptsächlich Zellkontakt-abhängig vermittelt zu werden [92]. Auch die Sekretion der inhibitorischen Zytokine IL10 und TGF β scheint *in vivo* wichtig für die Suppression zu sein [91]. Ob die Zytokine dabei von den Treg selbst oder aber von den Responderzellen sezerniert werden, ist noch nicht abschließend geklärt [93]. Es wird vermutet, dass der *in vivo* Effekt durch eine membrangebundene Form von TGF β auf der Zelloberfläche vermittelt wird [94]. Desweiteren wird die Rolle von CTLA-4 und glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related gene (GITR) bei der suppressiven Funktion von Tregs beschrieben [95]. *In vitro* scheint die nTreg vermittelte Suppression unabhängig von Zytokinen zu verlaufen. Sie ist *in vitro* sogar unabhängig von der Wirkweise der immunsuppressiven Moleküle IL10 und TGF β . So können Treg aus IL10 knockout Tieren ebenso effektiv supprimieren wie Treg aus Wildtyp Mäusen [96, 97]

1.1.8 Regulatorische T Zellen und Leber

Regulatorische T Zellen scheinen bei der hepatischen Immunantwort eine wichtige Aufgabe zu übernehmen. So weisen chronisch erkrankte Hepatitis B Patienten eine erhöhte Anzahl an Treg im peripheren Blut auf [98]. Zudem gibt es eine positive Korrelation zwischen der Frequenz der Treg, der Hepatitis B DNA Viruslast im Serum und der Schwere der Erkrankung. Dies lässt einen Treg Einfluss auf das Fortschreiten der Erkrankung vermuten [99]. Auch bei chronischen HCV Infektionen scheinen Treg an der Abschwächung der HCV spezifischen T Zellantwort beteiligt zu sein und tragen somit zur viralen Persistenz bei [100, 101]. So kommen Treg in den Lebern chronisch infizierter HCV Patienten in großer Menge vor und machen etwa 30-50% aller intrahepatischen CD4 T Zellen aus [102].

Im peripheren Blut und der Tumormikroumgebung des Hepatozellulären Karzinoms (HCC) wurden erhöhte Mengen an Treg beschrieben [103, 104]. Die Anzahl der Treg korreliert mit der Tumorlast. In *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass HCC Kulturüberstände die Generierung von Treg förderten, was im Umkehrschluss einem Entkommen des Tumors vor der Immunsystemkontrolle entspricht [105].

Auch bei der Regulierung der Immunantwort nach Organtransplantation sind Treg von entscheidender Bedeutung. So zeigen Patienten mit einer akuten Abstoßungsreaktion eine verminderte Anzahl an Treg im Lebergewebe und peripherem Blut im Vergleich zu Patienten ohne Abstoßungsreaktion [106].

Auch in Mausmodellen, wie z.B. der ConA-induzierten Leberschädigung, konnte ein lokaler Anstieg an Tregs in der Leber beobachtet werden. Die Depletion von CD25+ Zellen war mit einer stärkeren ConA-Schädigung assoziiert, während der Transfer von CD25+ Zellen oder Tregs den ConA-induzierten Leberschaden abschwächten [107]. Das Modell der nichtalkoholisch induzierten Fettlebererkrankung zeigte einen Verlust der hepatischen Tregs, welcher assoziiert war mit der entstandenen Steatose. Dies resultierte in einer verstärkten Leberentzündung [108].

1.1.9 Regulatorische T Zellen und autoimmune Lebererkrankungen

Deskriptive humane Studien postulieren bei autoimmunen Lebererkrankungen eine pathogenetische Beteiligung einer verminderten Zahl und/oder Funktion regulatorischer T Zellen.

Bei PBC Patienten konnte eine erhöhte Anzahl an nTreg in lymphozytärer Infiltraten des Portaltrakts detektiert werden [109]. Die Ratio der Foxp3+ zu CD8+ Effektorzellen im peripheren Blut und an histologischen Schnitten der gesamten Leber war hingegen bei

PBC Patienten vermindert [110]. Es gibt keine Korrelation zwischen der verringerten Treg Anzahl und dem Grad der Erkrankung, dem Vorliegen von AMAs oder dem IgM Level. Nach einjähriger Behandlung mit Ursodeoxycholsäure stieg der prozentuale Anteil der Treg an [110, 111]. Bei einem Kind, welches mit einem genetischen Defekt der alpha Untereinheit (IL-2 Ra, CD25) des IL2 Rezeptor geboren wurde, konnten klinische Merkmale der PBC diagnostiziert werden, was ein weiterer Hinweis darauf sein könnte, dass die Reduktion der Treg Anzahl ein wichtiger Faktor bei der PBC Erkrankung ist [112]. Auch bei der autoimmunen Hepatitis wurden eine verminderte Anzahl und/oder Funktion von Treg beschrieben. So zeigte sich eine verminderte Anzahl an Treg im peripheren Blut von Patienten mit aktiver AIH im Vergleich zu Patienten in Remission [113], [114]. Es scheint einen inversen Zusammenhang zwischen der prozentualen Treg Anzahl und den Erkrankungsmarkern, wie LKM1 oder SLA Antikörpern, zu geben, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass eine verminderte Treg Anzahl die serologische Manifestation der Erkrankung erhöht [112, 113, 115, 116].

1.1.10 Regulatorische Zellen als Therapeutikum

Da viele autoimmunbedingte Erkrankungen anscheinend direkt durch Treg Dysfunktionen oder deren verminderter Anzahl verursacht werden, könnte der adoptive Transfer von regulatorischen Zellen eine attraktive Alternative bieten, um die immunsuppressive Aktivität dieser Zellen zu nutzen. So könnten Treg Zellen aus Patienten isoliert, *ex vivo* angereichert und expandiert werden, um anschließend wieder infundiert zu werden [117]. In Tiermodellen konnte bereits ein erfolgreicher adoptiver Treg Transfer durchgeführt werden. Die Entstehung von Diabetes Typ I in Nonobese diabetic (NOD) Mäusen konnte durch den adoptiven Transfer von frisch isolierten polyklonalen oder antigenspezifischen Treg Zellen verhindert werden [118, 119].

Die Möglichkeit, periphere Treg aus dem Blut zu expandieren, wurde vorangetrieben durch die Entdeckung, dass das immunsuppressive Medikament Rapamycin selektiv die Expansion von nTreg gegenüber konventionellen T Zellen fördert [120]. Die Aktivierung humaner T Zellen unter Zugabe von Rapamycin führte dabei zu einem Wachstum der CD4+CD25+Foxp3+ Treg Population und selektiver Depletion der CD4+CD25- T Effektorzellen. Diese Rapamycin expandierten nTreg Zellen waren in der Lage sowohl die Proliferation syngener, wie auch allogener T Zellen zu supprimieren [121].

Neben der Expansion der nTreg ist vor allem die Methode der *in vitro* Expansion und Konversion von *ex vivo* CD4+T Zellen zu Foxp3+ Tregs für therapeutische Zwecke interessant, da hier ggf. Donorzellen, welche in wesentlich größerer Anzahl vorkommen, direkt aus einem Patienten isoliert und nach Konvertierung und Expansion in großer

Anzahl und ohne Akzeptanzprobleme in denselben Patienten retransfundiert werden könnten [122]. Dass transferierte iTreg funktionell aktiv sind und auch Antigen-unspezifisch Entzündungsreaktionen supprimieren können, wurde z.B. im Zelltransfer-Colitis Modell [123], in einer durch Herpes Simplex Virus induzierten Keratitis [124] und bei multifokaler Entzündung von Scurfy Mäusen beschrieben [125]. Allerdings wäre die Induktion und der Transfer von instabilen Foxp3⁺ T Zellen, die eventuell im Patienten wieder zu Foxp3⁻ T Zellen re-konvertieren und somit ihre Suppressorfunktion verlieren könnten, wenig hilfreich und könnte unter Umständen sogar zur Verschlechterung des Krankheitsbildes führen [122].

1.1.11 Zielsetzung

Der Verlust der immunologischen Toleranz in der Leber im Rahmen von autoimmunen Lebererkrankungen stellt ein therapeutisches Problem dar. Die bisherigen Therapieformen, durch unspezifische Immunsuppression, sind mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden und oftmals unzureichend wirksam. Das Ziel der Arbeit war:

- 1) Die Etablierung und Charakterisierung von Mausmodellen antigen-spezifischer und antigen-unabhängiger portaler Entzündung. Für die antigen-spezifische portale Entzündung sollten Transferversuche von CD8⁺ Zellen aus transgenen OT1 Tieren in K14OVAp Empfängertiere durchgeführt werden. Die OT1 transgenen Tiere tragen einen spezifischen Rezeptor für das SINFEELK Peptid auf ihren CD8⁺ T Zellen. K14OVAp Tiere exprimieren unter Kontrolle des humanen Keratinpromotors das SINFEELK Peptid u.a. auf ihren Gallengangsepithelzellen. Des Weiteren sollte der Entzündungsverlauf in MDR2^{-/-} Tiere untersucht werden. Diese Tiere entwickeln aufgrund einer gerichteten Deletion des MDR2 (Abcb4) Gens der Phospholipid-Flipase eine spontan sklerosierende Cholangitis mit makroskopischen und mikroskopischen Eigenschaften der humanen PSC, wie extra- und intrahepatische biliäre Stenosen, konzentrische periduktuale Fibrose und fokale Obliteration der Gallengänge. Hierfür sollten männliche und weibliche Tiere unterschiedlichen Alters analysiert werden. Histologische und serologische Untersuchungen beider Modelle waren dabei von entscheidender Bedeutung für die weiteren Transferversuche.
- 2) Im Anschluss an die Etablierung der Tiermodelle sollte der Einfluss des adoptiven Transfers von regulatorischen T Zellen auf die Leberentzündung untersucht werden. Durch den adoptiven Transfer von frisch isolierten polyklonalen oder antigenspezifischen Treg Zellen konnte, wie bereits beschrieben, die Entstehung einiger Erkrankungen verhindert werden. Ob frisch isolierte nTreg ebenfalls in der

Lage sind, in den dann etablierten entzündlichen Lebererkrankungsmodellen eine Entstehung bzw. den Verlauf der Entzündung zu beeinflussen, sollten die geplanten Transferversuche zeigen. Hierfür sollten einmalig oder wiederholt nTreg in die entsprechenden Modelle transferiert und der Verlauf der Entzündung analysiert werden.

- 3) Da nTreg im Organismus nicht in großen Mengen vorliegen, war die Expansion bzw. die Generierung von Treg *in vitro* von großem Interesse. Aus diesem Grund sollte eine Weiterentwicklung der *in vitro* Konversion von CD4⁺CD25⁻ T Zellen zu stabilen iTreg durchgeführt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Analysegerät zur Transaminasenmessung, Hitachi Modular-P800	Roche, Penzberg
Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
CO ₂ Inkubator	SANYO Biomedica, München
Digitalkamera Moticam 2500	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Durchflusszytometer: LSR II, FACS Canto	BD Biosciences, Heidelberg
Dynalmagnet, DynaMag-15	Invitrogen, Darmstadt
Lichtmikroskop, Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss Microimaging, Jena
MACS® MultiStand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikrotom (HM 335 E)	Microm, Walldorf
Mikrowelle	Bosch, München
Neubauer Zählkammer	Optik Labor Frischknecht, Balgach
Perfusionspumpe	Ismatec, Wertheim
Photometer MRX TC II	DYNEX Technologies GmbH, Denkendorf
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe, Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Präparationsbesteck	VWR International GmbH, Darmstadt
Reine Werkbank (BDK)	Luft und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
Schüttler, Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Soft-Imaging-Bildanalyse System	Soft Imaging System GmbH, Münster
Vortex, Reax 2000	Heidolph Instruments GmbH
Wasserbad	GFL, Großburgwedel
Zentrifuge, Megafuge 2.0	Heraeus Instruments GmbH, Osterode

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

5´Azathymidine	Sigma-Aldrich, Steinheim
7-AAD	BD Bioscience, Heidelberg
ABTS	Roth, Karlsruhe
Accu check Softclix XL	Roche
Anti-APC MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Antifect	Schülke&Mayr GmbH, Norderstedt
Anti-FITC MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Antigen Unmasking Solution	Vector, Kronshagen
APC Rat anti-Mouse CD8	BD Pharmingen, Heidelberg
Aqua ad iniectabilia	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
BD Golgi Plug	BD Pharmingen, Heidelberg
Beta-Estradiol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Biotin Rat anti-Mouse CD4	BD Pharmingen, Heidelberg
Bovines Serumalbumin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)	Invitrogen, Darmstadt
CellTrace	Invitrogen, Darmstadt
DDC=1,4- Dihydro-2,4,6-trimethylpyridin-	Sigma-Aldrich, Steinheim

3,5-dicarbonsäurediethylester 99%	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
DNase I	Roche, Mannheim
Dynabeads® M-450 Epoxy	Invitrogen, Darmstadt
Dynabeads® Mouse CD8 (Lyt 2)	Invitrogen, Darmstadt
Dynabeads® Mouse Pan B (B220)	Invitrogen, Darmstadt
Ethanol	Walter, Kiel
Fc Block, Anti-Mouse CD16/CD32	eBioscience, Frankfurt
Fetales Kälberserum	Invitrogen, Darmstadt
FITC Rat anti-Mouse CD25	BD Pharmingen, Heidelberg
FITC Rat anti-Mouse CD8	BD Pharmingen, Heidelberg
Histoacryl	Braun, Melsungen
IgG aus Mausserum	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Sigma-Adrich, Steinheim
Kanülen, BD Microlance	BD Biosciences, Heidelberg
Ketamin	aniMedica GmbH, Senden
LS-Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MAC1 Hybridom, rat anti-mouse CD11b	
MACS®Pre-Separation Filters	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Maxisorp Microtiterplatten	Nunc, Schwerte
MS-Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Nylonsieb Cell Strainer 100µm, 40µm	BD Biosciences, Heidelberg
Optiprep	Sigma-Aldrich, Steinheim
Panserin 401	PAN BIOTECH GmbH, Aidenbach
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Darmstadt
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Polap Plus AP Polymer Kit	Zytochem, Berlin
Proleukin (IL-2)	Novartis, Nürnberg
Purified NA/LE Hamster Anti-Mouse CD28	BD Pharmingen, Heidelberg
Purified NA/LE Hamster Anti-Mouse CD3e	BD Pharmingen, Heidelberg
Rapamycin	Wyeth Pharmaceuticals, New York
Rat anti Mouse F4/80 antigen Biotin	Serotec, Düsseldorf
Reaktiongefäße 1,5ml, 2ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 15ml, 50ml	greiner bio-one, Frickenhausen
Recombinant Human TGFβ1	R&D Systems, Wiesbaden
Retinoic Acid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Röhren, Flow Cytometry	Sarstedt, Nümbrecht
Rompun 2%	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Schwefelsäure 2N Lösung	Roth, Karlsruhe
Spritzen, BP Plastipak	BD Biosciences, Heidelberg
Ssniff R/M-H, Mehl e.v.	Ssniff Spezialitäten, Soest
Stabpipetten	greiner bio-one, Frickenhausen
Sterilfilter Filtropur V50	Sarstedt, Nümbrecht
Streptavidin-MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Testosterone	Sigma-Aldrich, Steinheim
TMB Plus Ready-to-use Substrate	Kementec Diagnostics, Köln
Trypanblau (0.4%)	Invitrogen, Darmstadt
Vicyrl Plus	Johnson&Johnson Medical GmbH, Norderstedt

Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt
Zellkulturplatten Flachboden, Rundboden; 6-, 24-, 48-, 96- well Format	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.3 Immunhistochemie

Affinity Purified anti-mouse/rat Foxp3	eBioscience, Frankfurt
Dako Pen	Dako, Hamburg
Eindeckmedium Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin	Roth, Karlsruhe
Hämatoxylin	Roth, Karlsruhe
Neufuchsinlösung	Merk
Pikrinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyclonal Rabbit Anti-Rat Ig	Dako, Hamburg
Rat anti human CD3	Serotec, Düsseldorf
Sirius Red	Sigma-Aldrich, Steinheim
Superfrost Objektträger	Menzel, Braunschweig
Xylol	O. Kindler GmbH, Freiburg
ZytoChem-Plus AP Polymer-Kit	Zytomed Systems, Berlin

2.1.4 Kits

Kits	Hersteller
cDNA Synthese Kit for RT-PCR	Roche, Mannheim
Foxp3 Staining Buffer Set	eBioscience, Frankfurt
LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain Kit	Invitrogen, Darmstadt
mouse IFN γ DuoSet ELISA Development System	R&D Systems, Wiesbaden
Mouse IL-12p70 ELISA	eBioscience, Frankfurt
mouse IL-17 DuoSet ELISA Development System	R&D Systems, Wiesbaden
mouse IL-4 DuoSet ELISA Development System	R&D Systems, Wiesbaden
mouse TNF- α /TNFSF1A DuoSet ELISA Development System	R&D Systems, Wiesbaden
Murine IL-10 ELISA Development Kit	Peprtech, Hamburg
Murine IL-6 ELISA Development Kit	Peprtech, Hamburg
NucleoSpin® RNA/Protein	Machery Nagel, Düren
Anti-M2-3E-ELISA (IgG)	Euroimmun AG, Lübeck

2.1.5 Antikörper Durchflusszytometrie

Antikörper	Isotyp	Hersteller
CD25 FITC	Rat IgM,k	BD Pharmingen
CD3 PE	Hamster IgG1,k	BD Pharmingen
CD4 PE	Rat IgG2,k	BD Pharmingen
CD45.1 APC	Rat IgG2a,k	BD Pharmingen
CD45.1 FITC	Rat IgG2a,k	BD Pharmingen
CD45.2 PE	Rat IgG2a,k	BD Pharmingen
CD8 APC	Rat IgG2a,k	BD Pharmingen
CD8 FITC	Rat IgG2a,k	BD Pharmingen
CD8 PE	Rat IgG2a,k	BD Pharmingen
CD8 V450	Rat IgG2a,k	BD Pharmingen

Foxp3 APC	Rat IgG2a, κ	eBioscience
IFN γ FITC	Rat IgG1, κ	BD Pharmingen
NK1.1 V450	Mouse IgG2a, κ	BD Pharmingen
Valpha TCR FITC	Rat IgG2a, λ	BD Pharmingen
Vbeta 5.1, 5.2 TCR PE	Mouse IgG1, κ	BD Pharmingen

2.1.6 Puffer

1x PBS, pH 7,4

KCl	2,7mM
KH ₂ PO ₄	1,5mM
NaCl	137mM
Na ₂ HPO ₄	6,5 mM

1x ACK

NH ₄ Cl	150mM
KHCO ₃	10mM
EDTA	100mM

MACS-Puffer

1x PBS
0,5% BSA
2,5mM EDTA

Saponin-Puffer

1xPBS
1%BSA
0,5% Saponin

4%-ige Formalinlösung (gepuffert)

9,07g KH ₂ PO ₄	66mM
11,86g Na ₂ HPO ₄	66mM

+ 860 ml H₂O
+ 140 ml Formalin (37%)

⇒ pH 7,4

0,1%-ige Sirius Red Lösung

8 g Pikrinsäure in 400 ml H₂O dd (gesättigte Pikrinsäure)
(mind. 7,5g auf 500 ml)
+ 0,4g Sirius Red

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Für alle *in vivo* Studien wurden Mäuse im Alter von 6 - 8 Wochen verwendet. Dabei entstammten die Mausstämme FVB/N und C57Bl/6 der Zucht des Tierstalls der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Zusätzlich wurden die folgenden transgenen und knockout Tiere verwendet:

K14OVAp	SIINFEKL Petipsequenz auf Gallengansepithelzellen
OT1	Transgener T Zellrezeptor für SIINFEKL auf K ^b -Molekülen
OT1xB6SJL/BoyJ	Transgener T Zellrezeptor und CD45.1 kongener Hintergrund
MDR2 ^{-/-}	Gerichtete Deletion des MDR2 (Abcb4) Gens der Phospholipid-Flipase
hCD2-TGFβ1	Aktives TGFβ1 T Zell spezifisch überexprimiert

Sämtliche Tiere wurden unter keimarmen Bedingungen bei einer konstanten Raumtemperatur (RT) von 20°C gehalten und erhielten Wasser und Futter ad libitum. Alle hier beschriebenen Studien wurden im Rahmen der Tierversuchsgenehmigung G46/09 „Mechanismen und Therapie der portalen Entzündung der Leber“ und G03/10 „Geschlechtsspezifische Unterschiede bei der Entstehung der Primär Biliären Zirrhose“ durchgeführt.

Da einige der transgenen Linien auf dem FVB/N Wildtyp- und andere auf dem C57Bl/6/J Wildtyp-Hintergrund waren, wurden beide Wildtypstämme als Kontrollen untersucht. Bei beiden Stämmen wurden im Folgenden alle Wildtypkontrollen als WT bezeichnet.

2.2.1.1 Zucht und Erhaltung transgener Mauslinien

Die Linien K14OVAp, OT1, MDR2 und CD2-TGFβ wurden homozygot gehalten und mittels PCR hinsichtlich des Transgenstatus untersucht. Um kongene Tiere aus OT1 und B6.SJL/BoyJ Tiere zu erhalten, wurden diese miteinander verpaart und die F1 Generation mittels PCR und Durchflusszytometrie auf den Transgenstatus überprüft.

2.2.2.2 Isolierung genomischer DNA aus Gewebe

Als Ausgangsmaterial zur Isolation der genomischen DNA wurden Ohr- oder Schwanzbiopsien der Mäuse verwendet. Diese wurden bei 55°C über Nacht in 2mg/ml Proteinase K in Proteinase K Puffer verdaut. Anschließend wurden die Proben 1:15 mit autoklaviertem, deionisiertem Wasser verdünnt und davon 2µl zur PCR-Analyse als Template eingesetzt.

2.2.1.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Zur Amplifikation mittels PCR wurden 2µl aus dem Proteinase K Gewebeverdau bei einem Gesamtvolumen von 25µl pro Probe eingesetzt. Für die Reaktion wurde standardmäßig der ReadyMix REDtaq zusammen mit einer 1pM Konzentration an Primern verwendet und die so amplifizierten Produkte durch Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und visualisiert.

Als Standard PCR-Protokoll diente folgende Vorlage:

- Nach einer Denaturierungsphase von 5 min bei 95°C folgten 30-35 Zyklen mit:
 - Denaturierung: 1 min bei 95°C
 - Annealing: 30 sec bei 55-65°C (Primerabhängig)
 - Elongation: 4 sec/ 100 Basenpaare bei 72°C
- Finale Elongation: 10 min bei 72°C

2.2.1.4 DNA Elektrophorese

Die Proben wurden auf ein 1% Agarosegel mit Gelred aufgetragen und entsprechend ihrer Größe in einer horizontalen Elektrophorese aufgetrennt. 0,5x TBE wurde als Laufpuffer verwendet. Als Größenmarker diente eine 100bp oder 1Kb DNA Leiter. Die Analyse des Gels erfolgte unter UV-Licht.

2.2.2 Isolierung von Primärzellen aus der Milz

Die Mäuse wurden mittels zervikaler Dislokation unter Narkose (Ketamin/Rompun/PBS=1/0,8/1; 200µl/Tier intraperitoneal) getötet. Die Milzen wurden entnommen und mit einem Spritzenkolben durch ein Sieb (100µM) in ein 50ml Reaktionsgefäß gerieben. Die Suspension wurde auf 20ml mit PBS aufgefüllt und unter Standardbedingungen: 430g, 5min, Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Es folgte eine Erythrozytenlyse durch Zugabe von ACK-Puffer (1ml/Milz). Nach einminütiger Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 20ml PBS abgestoppt und die Zellsuspension erneut durch ein Sieb (40µm) filtriert. Die Suspension wurde auf 50ml mit PBS aufgefüllt und unter Standardbedingungen (430g) zentrifugiert. Der Überstand wurde nach Zentrifugation verworfen und das entstandene Pellet enthielt die Primärzellen, welche in Medium oder PBS resuspendiert und gezählt wurden.

2.2.2.1 Isolation von CD4⁺ CD25⁻ T Lymphozyten aus der Milz

Aus den Milzen wurde, wie in 2.2.2 beschrieben, eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen (Standardbedingungen: 430g, 5min, Raumtemperatur) und mittels Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) sortiert. Die Zellen wurden hierfür in MACS-Puffer (1ml/10⁸ Zellen) resuspendiert und mit anti-CD25 FITC-AK für 15min bei 4°C inkubiert (10µl/ml/10⁸ Zellen). Es folgte ein Waschschriff, nachdem die Zellen wieder in MACS-Puffer resuspendiert und mit anti-FITC Magnetbeads (100µl/ml/10⁸ Zellen) inkubiert (15min, 4°C) wurden. Die Zellen wurden erneut gewaschen und in der Zwischenzeit wurden LS-Säulen in den Magnetständer eingespannt und mit 3ml gekühltem MACS-Puffer äquilibriert. Die gewaschenen Zellen wurden in 4ml MACS-Puffer resuspendiert und auf die erste Säule gegeben. Die CD25⁺ Zellen wurden in der Säule zurückgehalten. Im Durchfluss befanden sich die CD25⁻ Zellen, welche weiter nach CD4 positiven Zellen aufgereinigt wurden. Hierfür erfolgte die Inkubation mit Biotin-gekoppeltem anti-CD4 Antikörper für 15min bei 4°C (1,5µl/10⁸ Zellen). Anschließend wurden die Zellen gewaschen, in MACS-Puffer resuspendiert (1ml/10⁸ Zellen) und mit Streptavidin-gekoppelten Magnetbeads inkubiert (25µl/10⁸ Zellen, 15min bei 4°C). Die Zellen wurden nach erneutem Waschen in 4ml MACS-Puffer aufgenommen und auf die erste Säule gegeben. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule dreimal mit 3ml MACS-Puffer gespült. Anschließend wurden die magnetisch an die Säule gekoppelten CD4⁺ T Zellen eluiert, indem die erste Säule aus dem Magnetfeld entfernt, mit 5ml MACS-Puffer gefüllt und der Puffer mittels eines Stempels in die zweite Säule überführt wurde. Erneut wurde dreimal mit 3ml MACS-Puffer nachgespült und die in der Säule befindlichen Zellen wurden in ein 15ml Reaktionsgefäß eluiert. Um kontaminierende CD8⁺ T Zellen, B Zellen und Makrophagen zu entfernen, wurden die Zellen nach einem weiteren Waschschriff in 1ml Medium aufgenommen und mit magnetischen Dynalbeads (5µl anti-CD8, 10µl anti-B220, 5µl anti-MAC-1 pro 5x10⁷ Zellen) für 15min bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Um die Aufreinigung zu wiederholen, wurde die Zellsuspension anschließend auf 6ml mit MACS-Puffer aufgefüllt und 2min in einen entsprechenden Magneten eingespannt. Die Bead-gekoppelten Zellen wurden an die Wand des Reaktionsgefäßes gezogen und so aus der Zellsuspension entfernt. Die Zellsuspension wurde in ein zweites Gefäß überführt, auf 10ml aufgefüllt, erneut in das Magnetfeld eingebracht, um die Aufreinigung zu wiederholen. Anschließend wurden die Zellen unter Standardbedingungen zentrifugiert und in Kulturmedium aufgenommen. Die Reinheit der so isolierten CD4⁺ T Zellen wurde durchflusszytometrisch überprüft und betrug 95-98%.

2.2.2.2 Isolation von CD4+CD25+ T Lymphozyten aus der Milz

Aus den Milzen wurde, wie in 2.2.2 beschrieben, eine Einzelzellsuspension hergestellt und die Erythrozyten mittels ACK Puffer lysiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, in MACS-Puffer resuspendiert und mit anti-CD25 FITC-AK für 15min bei 4°C inkubiert (10µl/ml/10⁸ Zellen). Nach erneutem Waschen wurden die Zellen erneut in MACS-Puffer aufgenommen und mit anti-FITC Magnetbeads (100µl/ml/10⁸ Zellen) inkubiert (15min, 4°C). Es folgte ein weiterer Waschschrift. Anschließend wurden die Zellen auf eine äquilibrierte LS-Säule aufgebracht. Die CD25+ Zellen wurden in der Säule zurückgehalten. Im Durchfluss befanden sich die CD25- Zellen, die entsprechend dem Protokoll 2.2.2.1 weiter nach CD4 positiven Zellen aufgereinigt wurden.

Für die Isolation der CD4+CD25+ T Zellen wurden die in der Säule befindlichen CD25+ Zellen weiter über eine zweite Säule aufgereinigt und schließlich in 5ml MACS-Puffer eluiert. Da eine weitere positive Selektion der Zellen aufgrund der bereits gekoppelten Magnetbeads nach CD4+ mittels MACS nicht möglich war, wurden die CD4+ Zellen durch die Depletion von CD8+Zellen, B Zellen und Makrophagen mittels Dynabeads (7,5µl anti-CD8, 15µl anti-B220, 7,5µl anti-MAC1 pro 5x10⁶ Zellen) weiter angereinigt (siehe 2.2.2.1) Die Reinheit der so isolierten CD4+CD25+ Zellen wurde durchflusszytometrisch überprüft und betrug etwa 80-85%.

2.2.2.3 Isolation von CD4+CD25+ T Lymphozyten aus der Milz mittels Zellsorter

Aus den Milzen wurde, wie in 2.2.2 beschrieben, eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und wie unter 2.2.2.1 und 2.2.2.2 mit anti-CD25 FITC AK gefärbt und anschließend mit anti FITC Magnetbead gekoppelt. Die mit FITC Magnetbeads gekoppelten Zellen wurde auf eine äquilibrierte LS-Säule aufgebracht und die Säule dreimal mit 3ml MACS-Puffer gespült. Der Durchfluss enthielt die CD4+CD25- Zellen und wurde in einem 15ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Die magnetisch an die Säule gekoppelten CD4+CD25+ T Zellen wurde auf eine zweite Säule gebracht, dreimal mit 3ml MACS-Puffer gespült und anschließend, die in der Säule befindlichen Zellen, in ein 15ml Reaktionsgefäß zu eluiert.

Die gewonnenen CD4+CD25+ T Zellen wurden unter Standardbedingungen zentrifugiert und das Pellet mit MACS Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt und mit anti-CD4 PE AK für 15min bei 4°C inkubiert (10µl/ml/10⁸ Zellen). Erneut wurden die Zellen gewaschen und in PBS resuspendiert. Die Zellzahl wurde auf 1x10⁸ Zellen/ml eingestellt und die Zellen auf Eis zum Sorter gebracht. Das Zellsorting wurde in Kooperation mit der Interdisziplinären Klinik für Stammzelltransplantation am BD FACS Aria durchgeführt. Die Reinheit der so isolierten CD4+ T Zellen wurde durchflusszytometrisch überprüft und betrug 97%-98%.

2.2.2.4 Isolation von CD8+ T Lymphozyten aus der Milz

Aus den Milzen wurde, wie in 2.2.2 beschrieben, eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, in MACS-Puffer resuspendiert und mit anti-CD8 FITC-AK für 15min bei 4°C inkubiert (10µl/ml/10⁸ Zellen). Nach erneutem Waschen wurden die Zellen wieder in MACS-Puffer aufgenommen und mit anti-FITC Magnetbeads (100µl/ml/10⁸ Zellen) inkubiert (15min, 4°C). Es erfolgte ein weiterer Waschschrift. Anschließend wurden die Zellen auf eine äquilibrierte LS-Säule aufgebracht. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule dreimal mit 3ml MACS-Puffer gespült. Anschließend wurden die magnetisch an die Säule gekoppelten CD8+ T Zellen mit 5ml MACS-Puffer auf eine weitere äquilibrierte LS- Säule gegeben. Erneut wurde dreimal mit 3ml MACS-Puffer nachgespült. Anschließend wurden die in der Säule befindlichen Zellen in ein 15ml Reaktionsgefäß eluiert. Die Reinheit der so isolierten CD8+ T Zellen wurde durchflusszytometrisch überprüft und betrug 95-98%.

2.2.2.5 Isolierung von Leberlymphozyten

Die Mäuse wurden durch zervikaler Dislokation unter Narkose (Ketamin/Rompun) getötet. Das Peritoneum wurde eröffnet und die Pfortader vorsichtig freigelegt. Mit einer Kanüle wurde in die Pfortader eingestochen und die Vena cava eröffnet. Die Leber wurde für etwa 20 sec mit 5ml PBS perfundiert (10ml/min). Anschließend wurde die Leber freipräpariert, entnommen und die Gallenblase entfernt. Nach Entnahme wurde die Leber mit einem Spritzenkolben durch ein 100µm Sieb in ein 50ml Reaktionsgefäß gerieben. Zur Entfernung der Hepatozyten wurde die Suspension auf 50ml mit PBS aufgefüllt und für 4 min bei 400rpm zentrifugiert. Die Hepatozyten konnten sich absetzen, die nichtparenchymatösen Zellen verblieben im Überstand. Um weitere Hepatozyten zu entfernen wurde der Überstand erneut in ein 50ml Reaktionsgefäß überführt und nochmals für 4 min bei 400rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut in ein 50ml Reaktionsgefäß überführt und für 7 min bei 1500rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Das entstandene Pellet wurde mit 4,5ml PBS resuspendiert und mit 2,5ml Optiprep vermischt. Durch vorsichtiges Überschichten mit 1ml PBS wurde ein Dichtegradient hergestellt der anschließend bei RT für 20min bei 400g ohne Bremse zentrifugiert wurde. Die Leberlymphozyten (nichtparenchymatösen Zellen) befanden sich in der Intermediärphase zwischen PBS und verbliebenen Erythrozyten und Hepatozyten und wurden vorsichtig abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Leberlymphozyten wurden auf 20ml mit PBS aufgefüllt und für 5 min bei 1500rpm zentrifugiert. Das entstehende Pellet enthielt die Leberlymphozyten, welche dann in Medium oder PBS resuspendiert und gezählt wurden

2.2.3 Zellkulturmedium

Als Zellkulturmedium diente serumfreies Panserin-Medium versetzt mit 1% Penicillin/Streptomycin.

2.2.4 Konversion von CD4+CD25- T Lymphozyten

Für die Konversionsversuche wurden CD4+CD25- Milzzellen (siehe 2.2.2.1) aufgereinigt. 96 well Zellkulturplatten wurden mit anti-CD3 AK geschichtet (2µg/ml PBS, 50µl/well, >1h bei 37°C). Ungebundener AK wurde durch Waschen mit PBS entfernt. Pro well wurden 5×10^5 Zellen in 200µl Zellkulturmedium ausgesät. Die Zellen wurden mit anti-CD28 AK (2µg/ml) kostimuliert und dem Medium IL-2 (50U/ml) zugegeben. Um den Einfluss verschiedener Faktoren auf die Entstehung regulatorischer T Zellen in der Kultur zu untersuchen, wurden folgende Substanzen je nach Versuchsansatz zugesetzt:

TGFβ (0-4ng/ml), 5´Azathymidin (5µM), Retinoic Acid (1nM), Rapamycin (10nM)

Die Analyse der Konversionsrate erfolgte nach 4 tägiger Zellkultur mittels Durchflusszytometrie.

2.2.5 Restimulation von Zellen für die Detektion von Zytokinen

Für die Restimulation wurden isolierte T Zellen in 1ml Zellkulturmedium aufgenommen und gezählt. 96 well Zellkulturplatten wurden mit anti-CD3 AK gecoatet (3µg/ml PBS, 50µl/well, >1h bei 37°C) und ungebundener AK wurde anschließend durch Waschen mit PBS entfernt. Pro well wurden 5×10^5 Zellen in 200µl Zellkulturmedium ausgesät und mit anti-CD28 AK (2µg/ml) kostimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden nach 24h abgenommen und bis zur weitere Analyse bei -20°C eingefroren.

2.2.6 Zellzählung

Die Zellzählung wurde mittels einer Neubauer Zählkammer durchgeführt. Die Zellsuspension wurde dafür in einer entsprechenden Verdünnung mit Trypanblau verdünnt und die Zellzahl anschließend in zwei der vier Quadranten der Zählkammer ausgezählt. Die Blaufärbung toter Zellen ermöglichte zusätzlich zur Zellzahlbestimmung die Bestimmung der Zellvitalität. Die gesamte Zellzahl errechnete sich anhand der Formel: Zellzahl gesamt = gezählte Zellzahl / 2 x Verdünnungsfaktor x Volumen Zellsuspension x Kammerfaktor (10^4)

2.2.7 Zellcharakterisierung

2.2.7.1 Vitalitätstest

Um tote Zellen im Durchflusszytometer ausschließen zu können, wurden die Zellen mit den Farbstoffen Pacific Orange-NHS (PacO-NHS) oder Aqua (LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit) gefärbt. Das Prinzip beider Färbungen beruht darauf, dass die Farbstoffe in tote Zellen, nicht jedoch in vitale Zellen mit intakter Zellmembran eindringen können. Dort reagieren sie mit freien Aminen im inneren der Zelle. Somit konnten tote Zellen anhand ihrer höheren Fluoreszenzintensität von lebenden Zellen abgegrenzt werden.

Pacific Orange-NHS (PacO-NHS) Färbung

Die zu färbenden Zellen wurden in 5ml Röhrchen überführt und gewaschen. PacO-NHS wurde 1:1000 in PBS verdünnt und die Zellen in 200µl der Verdünnung resuspendiert. Anschließend erfolgte eine 30 minütige Inkubation der Zellen auf Eis. Die Zellen wurden danach unter Standardbedingungen gewaschen und in 4%PFA fixiert (15min, 4°C) oder in PBS für weitere Färbungen aufgenommen.

LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit

Die Aqua-Färbung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Es folgten Fixation der Zellen oder weitere Färbungen.

2.2.7.2 Proliferation

Isolierte T Zellen wurden nach der Isolation mit Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) oder CellTrace gefärbt. Bei jeder Zellteilung nimmt die Fluoreszenzintensität des Farbstoffs um die Hälfte ab, so dass mittels Durchflusszytometrie ermittelt werden kann, wie oft die Zellen sich geteilt haben. Verlaufen die Zellteilungen synchron, so lassen sich definierte Peaks darstellen, ist das nicht der Fall, so zeigt sich eine Abnahme der mittleren Fluoreszenzintensität.

CFSE-Färbung

Nach der Isolation wurden die Zellen in 1ml PBS resuspendiert (bis 5×10^7 Zellen). Der CFSE-Stock [1mM in DMSO; 100µl] wurde mit 100µl PBS auf 0,5mM verdünnt. Davon wurden 4µl zu den Zellen gegeben. Die Zellsuspension wurde kurz gevortext, um eine gleichmäßige Färbung der Zellen zu gewährleisten und bei 37°C im Schüttler für 6min inkubiert. Zum Abstoppen der Färbereaktion wurde 1ml FCS zugegeben. Anschließend wurden die Zellen dreimal gewaschen und in Kulturmedium aufgenommen.

CellTRACE

Nach der Isolation wurden die Zellen in 1ml PBS resuspendiert (bis 5×10^7 Zellen). CellTrace (10 μ l/ 5×10^7 Zellen) wurde für 20min bei 37°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal unter Standardbedingungen gewaschen, resuspendiert und in Kulturmedium oder PBS aufgenommen.

Um die gleichmäßige Färbung der Zellen zu kontrollieren und die Fluoreszenzintensität der ungeteilten Zellen zu messen, wurden sowohl bei der CFSE, wie auch bei der CellTRACE Färbung eine Probe entnommen und in 4%PFA für 15min bei 4°C fixiert.

2.2.8 Durchflusszytometrie

2.2.8.1 Färbung von Oberflächenmarkern

Für die Färbung von Oberflächenantigenen wurden die Zellen in PBS/2%BSA aufgenommen (10^5 - 5×10^6 Zellen/100 μ l) und in 5ml Röhrchen überführt. Je nach AK-Konzentration wurden die Zellen mit 1-10 μ l AK/Probe gefärbt (15min, 4°C). Die Röhrchen wurden mit 1ml PBS/2%BSA aufgefüllt, 5 min bei 472g zentrifugiert und der Überstand wurde vorsichtig abgeschüttet. Es folgte die Fixation der Zellen mit PFA (4%, 15min, 4°C). Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen entweder in 300 μ l PBS resuspendiert und bis zur Analyse bei 4°C dunkel gelagert oder es erfolgte eine intrazelluläre Zytokinfärbung.

2.2.8.2 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Nach der PFA Fixierung (s.o.) wurden die Zellen zweimal mit 1ml Saponinpuffer (PBS/2% BSA/0.5%/Saponin) gewaschen, wodurch die Membran permeabilisiert wurde. Der Überstand wurde abgeschüttet, die Zellen in 50 μ l Saponinpuffer resuspendiert und mit 1-2 μ l anti-IFN γ Antikörper inkubiert (>30min oder über Nacht bei 4°C). Anschließend wurden erneut mit 1ml Saponinpuffer gewaschen, in 400 μ l PBS resuspendiert und bis zur Analyse bei 4°C im Dunkeln gelagert.

2.2.8.3 Färbung von regulatorischen T Zellen

Nach der Oberflächenfärbung von CD4 und CD25 wurden die Zellen mit PBS gewaschen und die Foxp3 Färbung mit Hilfe des Foxp3-Staining Buffer Sets (eBioscience) nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach der Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen mit Permeabilisierungspuffer gewaschen, in 20 μ l Permeabilisierungspuffer resuspendiert und 15min bei 4°C mit Fc-Block inkubiert (0,2 μ l/Probe). Anschließend

wurde der Foxp3 AK ohne weiteren Waschschrift zugegeben (1µl/Probe) und die Färbung erfolgte über Nacht. Die Proben wurden in Permeabilisierungspuffer gewaschen, in 400µl PBS resuspendiert und bis zur Analyse bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.2.8.4 Durchflusszytometrie

Für die Analyse von Zellen im Durchflusszytometer (FACS Canto; LSRII) wurden Einzelfärbungen für die verschiedenen Fluorochrome angefertigt, um die Fluoreszenzkanäle zu kompensieren. Zur Berücksichtigung der Autofluoreszenz wurden ungefärbte Zellen eingelesen. Zusätzlich wurden Isotypenkontrollen mitgefärbt, welche die Hintergrundfluoreszenz der verwendeten Antikörper zeigten. Tote Zellen und Dubletten wurden nicht in die Analysen miteinbezogen. Die Auswertung erfolgte mit der Software Diva5 und Diva6.

2.2.9 Zytokinbestimmung im Zellkulturüberstand

Die Zytokinbestimmung erfolgte mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). Hiefür wurden zwei Antikörper verwendet, welche jeweils spezifisch das gleiche Molekül, jedoch unterschiedliche Epitope erkennen. Über den Erstantikörper wurde die zu detektierende Substanz aus Zellkulturüberstand an eine Microtiterplatte gebunden. Es folgte die Inkubation mit biotinyliertem Zweitantikörper und Streptavidin-gekoppelter Meerrettich-Peroxidase. Durch Zugabe des Substrats kam es zu einem Farbumschlag, welcher photometrisch gemessen werden konnte. Bei jeder Messung wurde ein Standard mitgeführt, anhand dessen die gemessene optische Dichte in eine Proteinkonzentration umgerechnet werden konnte.

Für die Detektion von IFN γ , IL-17, TNF α , IL-12 und IL-4 wurde Tetramethylbenzidin (TMB, fertige Gebrauchslösung) als Substrat der Peroxidase verwendet. Bei der Messung von IL-10 und IL-6 wurde Diammonium-2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure (ABTS) verwendet. Hierzu wurden 1mg/ml ABTS in Citratpuffer (pH 4,5) gelöst und 37%iges H₂O₂ (20µl/10ml) unmittelbar vor der Detektion zugegeben. Alle Zytokinbestimmungen wurden dabei nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.10 Immunhistochemie (IHC)

2.2.10.1 Organpräparation

Organe wurden entnommen und über Nacht bei RT in 4%iger Formalinlösung gelagert. Nach 24 Stunden wurden die Lebern für 2 h in aqua dest. gewässert. Es folgte eine aufsteigende Alkoholreihe mit 20%igem Isopropanol und 40%igem Isopropanol für je 45 min und anschließender Lagerung in 70% Isopropanol. Die Einbettung der Organe in Paraffin erfolgte in der Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf.

Für die Cryokonservierung wurden Gewebestücke auf Trockeneis in Einbettungsmedium (Tissue Tek®) eingebettet und bei -80°C gelagert

2.2.10.2 Herstellung der Schnitte

Aus den in Paraffin eingebetteten Organen wurden am Mikrotom 3 µm dicke Schnitte hergestellt und auf Superfrost-Objektträger gebracht.

2.2.10.3 Hämatoxilin-Eosin Färbung

Die Organschnitte wurden in einem Xylolbad entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (je 5 Minuten in 100%, 90%, 80% und 70% Ethanol) rehydriert. Nach Spülung mit Wasser erfolgte eine Inkubation für 5 min in einer Hämatoxilin-Färbelösung. Anschließend wurden die Schnitte für 10 min in warmem Wasser gewaschen, bevor sie für 5 min in einer Eosin-Färbelösung inkubiert wurden. Nach erneuter Waschung mit Wasser erfolgte die Entwässerung durch eine aufsteigende Alkoholreihe. Nach Xylol-Behandlung wurden die Schnitte mit Eindeckmedium (Entellan) eingedeckt.

2.2.10.4 Sirius Red Färbung

Bei dieser Färbung stellen sich die Kollagenfasern rot dar, während Muskelfasern und Zytoplasma gelb erscheinen. Im polarisierten Licht ist das Verfahren eine sehr sensitive Methode zum Nachweis von Kollagenen. Dabei färben sich große Fibrillen gelb-orange, kleine hingegen grün an. Zur Färbung wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert, dann einer absteigenden Alkoholreihe unterzogen, mit Aqua dest. gespült und mind. 60 min in der Sirius Red Lösung gefärbt. Es erfolgte eine kurze Spülung mit HCL und Entwässerung mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe. Nach Xylol-Behandlung wurden die Schnitte mit Eindeckmedium (Entellan) eingedeckt.

2.2.10.5 Foxp3/CD3 Färbung

Die Organe wurden in einem Xylolbad entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (je 5 min in 100%, 90%,80% und 70% Ethanol) rehydriert. Die Organe wurden anschließend auf dem Objektträger mit einem Fettstift (Dako Pen) eingekreist. Es folgte eine Antigendemaskierung mittels Citratpuffer für 35 min bei 680 Watt in der Mikrowelle. Die Schnitte wurden für etwa 10 min auf Eis auf RT runtergekühlt und anschließend 3 mal mit aqua dest. und 3 mal mit PBS für je 5 min gewaschen. Es folgte 5 min Blockung mit Blocking Puffer aus dem entsprechenden Polap Kit. Der Primär Antikörper wurde 1:200 in Zytomedpuffer verdünnt und ü.N. bei 4°C in feuchter Kammer inkubiert. Am nächsten Morgen wurde 3 mal 5 min mit PBS gewaschen. Der 2.Antikörper wurde 1:200 verdünnt und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 3 mal mit PBS für 5 min gewaschen, bevor für 30 min 50 µl anti rabbit AP Komplex Polap Kit auf die Schnitte gegeben wurde. Nach erneuter PBS Waschung für 5 min wurde frisch angesetzte Neufuchsinlösung für 10 min auf den Schnitt gegeben. Die Neufuchsinlösung wurde dann kurz unter fließendem Wasser abgewaschen, bevor die Gegenfärbung für 3 min mit Hämatoxylin erfolgte. Anschließend wurden die Schnitte für 10 min in warmem Wasser gewaschen, und es erfolgte die Entwässerung durch eine aufsteigende Alkoholreihe. Nach Xylol-Behandlung wurden die Schnitte mit Eindeckmedium (Entellan) eingedeckt.

2.2.10.6 Mikroskopische Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Anzahl der regulatorischen T Zellen in der Leber wurden von jedem Schnitt fünf repräsentative Entzündungsareale fotografiert, ausgezählt und mittels der Software analySIS[®] 3 (Soft Imaging System GmbH, Münster) vermessen. Die so ermittelte Zellzahl wurde dann in Relation zur gesamt ausgemessenen Fläche gesetzt und der Prozentsatz für die Gesamtzellzahl errechnet.

2.2.10.7 Modifizierter histologischer Aktivitätsindex (mHAI)

Zur histologischen Bestimmung des Entzündungsgrades der Leber wurden histologische Schnitte angefertigt, H&E gefärbt und anschließend nach dem modifizierten histologischen Aktivitätsindex verblindet ausgewertet. Der mHAI Score nach Ishak et al [126] beschreibt dabei detailliert das Ausmaß der entzündlichen Aktivität. Er setzt sich zusammen aus der Beurteilung der Interface Hepatitis (0-4), konfluenter Nekrose (0-4), Einzelzelluntergängen (0-4) und portaler Entzündung (0-4). Er ist mit einer Spanne von 0-18 Punkten ein genauer und komplexer Richtwert für klinische Studien.

2.2.11 Tierversuche

2.2.11.1 Bestimmung von Serumtransaminasen

Für die submandibuläre Blutentnahme wurde die Maus mit einer Hand fixiert, sodass eine Stauung der Vena submandibularis erfolgte. Die Vene wurde mit Hilfe einer Lanzette angestochen und das Blut in einem heparinisierten Reaktionsgefäß tropfenweise aufgefangen. Für die Blutentnahme durch Herzpunktion wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation unter Narkose (Ketamin/Rompun) getötet. Anschließend wurde das Peritoneum eröffnet und mit einer Kanüle durch das Diaphragma hindurch der Herzbeutel punktiert und das Blut entnommen. Zur Gewinnung von Serum wurde das gewonnene Blut mindestens 30 min bei RT stehen gelassen und anschließend abzentrifugiert (10 min, 3000rpm). Das Serum konnte als obere Phase abgenommen werden und wurde bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert. Die Aspartat-Aminotransferase (AST) und die Alanin-Aminotransferase (ALT), sowie die Alkalische Phosphatase (AP) wurden in der Abteilung für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gemessen.

2.2.11.2 Bestimmung von Antimitochondrialen Antikörpern im Blutserum

Die Bestimmung der Antimitochondrialen Antikörper (AMAs) erfolgte mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). Hiefür wurden zwei Antikörper verwendet, welche jeweils spezifisch das gleiche Molekül, jedoch unterschiedliche Epitope erkennen. Über den Erstantikörper wurde die zu detektierende Substanz aus Zellkulturüberstand an eine Microtiterplatte gebunden. Es folgte die Inkubation mit einem biotinyliertem Zweitantikörper und Streptavidin-gekoppelter Meerrettich-Peroxidase. Durch Zugabe des Substrats kam es zu einem Farbumschlag, welcher photometrisch gemessen werden konnte. Bei jeder Messung wurde ein Standard mitgeführt, anhand dessen sich der positive Schwellenwert der Serumspiegel bestimmen ließ. Die Durchführung des ELISA erfolgte dabei nach Herstellerangaben.

2.2.11.3 K14Ovap Mausmodell der Primär Biliären Zirrhose

Beim Mausmodell der Primär Biliären Zirrhose handelt es sich um ein im adulten Empfänger induzierbares Mausmodell. Hierfür wurden CD8⁺ T Zellen (wie unter 2.2.2.4 beschrieben) aus OT1 bzw OT1x B6.SJL/BoyJ Spendermäusen isoliert und adoptiv in transgene Empfängertiere (K14OVAp) transferiert. Die OT1 transgenen CD8⁺ T Zellen erkennen die SIINFEKL Antigenpeptidsequenz (OVA 257-264), welche von den K14-

OVAp Tieren unter dem humanen K14 Keratinpromoter auf Gallengangsepithelzellen exprimiert wird. Die rezipienten Mäuse erhielten die Donorzellsuspension in 200 µl PBS durch intraperitoneale Injektion. Zur Kontrolle der Leberwerte wurden einigen Tieren einmalig kleine Volumina Blut (ca. 0,05 ml) durch submandibuläre Punktion entnommen. Das Gewicht der Tiere wurde im Versuchsverlauf dokumentiert.

8 Tage nach OT1 CD8+ Zelltransfer wurden die Tiere durch zervikale Dislokation unter Narkose (Ketamin/Rompun) getötet. Die Tiere wurden zur Ermittlung der Leberwerte durch Herzpunktion entblutet und das Serum (unter 2.2.11.1 beschrieben) gewonnen. Organe wurden zur Zellisolation und für histologische Bestimmungen entnommen und entsprechend der beschriebenen Protokolle weiterverarbeitet.

2.2.11.4 Orchiektomie

Die männlichen Tiere wurden nach Einleitung der Narkose [10ml/kg/KGW Ketamin/Xylazin (Rompun®) [12mg Ketamin und 1,6 mg Xylazin (Rompun®) pro ml in 0,9% NaCl Lösung] in Rückenlage auf dem Operationstisch fixiert. Nach Rasur und präpubischer Hautdesinfektion erfolgte eine circa 0,6 cm lange abdominale Querinzision. Nach Auslagerung der Hoden wurde eine Ligatur mit einem Seidenfaden der Stärke 5-0 (USP) um Samenleiter und Gefäße gelegt. Der Hoden wurde abgetrennt und die Hautwunde mit einem Seidenfaden der Stärke 6-0 mit Einzelknopfnähten verschlossen.

2.2.11.5 Hormonpelletimplantation

Den kastrierten Tieren wurden Östrogen und den weiblichen Tieren Testosteron zugeführt. Hierfür wurden Slow-Release-Pellets der Größe 0,3 x 0,3 cm mit dem Wirkstoff 17β-Östradiol bzw Testosteron subkutan im Bereich des Nackens implantiert. Die Hormonpellets geben konstant eine definierte Hormonmenge über 60 Tage ab. Für die Pelletimplantation wurden die Tiere nach Einleitung der Narkose in Bauchlage auf dem Operationstisch fixiert. Nach Desinfektion des Operationsfeldes erfolgte ein circa 0,6 cm langer Hautschnitt median im Lumbalbereich. Mit einer dünnen Pinzette wurde subkutan stumpf bis zum Nacken präpariert, um auf diese Weise eine Hauttasche für das Pellet zu formen. Nach Platzierung des Hormonpellet wurde die Haut mit einem Seidenfaden der Stärke 6-0 mit zwei Einzelheften verschlossen.

2.2.11.6 Transfer regulatorischer T Zellen

Regulatorische T Zellen wurden (wie unter 2.2.2.2 bzw. 2.2.2.3 beschrieben) mittels MACS oder Zellsorter aufgereinigt. Anschließend wurden definierte Zellzahlen in 200µl PBS aufgenommen und den Tieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten intraperitoneal injiziert.

2.2.11.7 Induktion eines chronischen Gallengangsschadens/Cholangitis durch DDC Fütterung

Als Modell cholestatischer Lebererkrankungen wurde die DDC- (Diethoxycarbonyl-1,4-Dihydrocollidine) induzierte portale Inflammation verwendet. Den Tieren wurde hierfür ein 0,1% DDC-haltiges Futter verabreicht (1g DDC in 1kg Pulverfutter, angesetzt mit 800ml Wasser, getrocknet), welches nicht giftig und somit einfach in der Handhabung im Tierstall ist. Das Gewicht der Tiere wurde im Versuchsverlauf dokumentiert. Die Analyse erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten, wobei die Tiere zur Ermittlung der Leberwerte durch Herzpunktion entblutet und das Serum (wie unter 2.2.12.2 beschrieben) gewonnen wurde. Die Organe wurden zur Zellisolation und für histologische Bestimmungen entnommen und entsprechend der beschriebenen Protokolle weiterverarbeitet.

2.2.11.8 Rapamycingabe

mTOR Inhibitoren haben immunsuppressives, sowie antiproliferatives Potenzial. Die therapeutische Applikation von Rapamycin wurde daher in Modellen der chronischen Gallengangsschädigung (MDR2^{-/-} und DDC Fütterung) getestet. Den Tieren wurde täglich 1,5 mg Rapamycin pro kg Körpergewicht intraperitoneal über einen Zeitraum von 1-4 Wochen appliziert. Die Lösung von Rapamycin erfolgte in Ethanol und Aqua ad iniectabilia. Es ist nicht giftig und somit einfach in der Handhabung im Tierstall. Bei MDR2^{-/-} Mäusen wurde bereits im Alter von 2 Wochen mit der Therapie begonnen, da diese bereits zu diesem frühen Zeitpunkt Entzündungen in der Leber aufweisen. In den weiteren Tiermodellen wurde die Applikation im Tieralter von 6-8 Wochen begonnen. Das Gewicht der Tiere wurde im Versuchsverlauf dokumentiert. Die Analyse erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten, wobei die Tiere zur Ermittlung der Leberwerte durch Herzpunktion entblutet und das Serum (wie unter 2.2.12.2 beschrieben) gewonnen wurde. Die Organe wurden zur Zellisolation und für histologische Bestimmungen entnommen und entsprechend der beschriebenen Protokolle weiterverarbeitet.

2.2.12 Statistische Analysen

Alle dargestellten Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben.

Für die graphische und statistische Auswertung, sowie die Berechnung der Signifikanz wurde die Software GraphPad Prism[®] verwendet. Ergebnisse mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung einer portalen antigenabhängigen Entzündung im K14OVAp Mausmodell

Zur Etablierung eines Modells einer portalen Entzündung wurde das Modell der K14OVAp transgenen Maus verwendet, welche das OVA-SIINFEKL Peptid auf ihren Epithelzellen exprimieren. Durch Zelltransfer naiver OT1 CD8+ T Zellen, welche einen spezifischen T Zellrezeptor für das exprimierte SIINFEKL Peptid tragen, sollte eine Entzündung in den K14OVAp Tieren induziert werden. Zunächst musste hierfür die geeignete Zellzahl für die Induktion einer portalen Entzündung bestimmt werden. Aus diesem Grund wurden variable Zellzahlen der OVAp-spezifischen T Zellrezeptor tragenden OT1 transgenen CD8+ T Zellen in männliche und weibliche K14OVAp Empfängertiere transferiert. Bei den weiblichen Empfängertieren zeigte sich eine 100%-ige Sterblichkeitsrate an Tag 6 nach Transfer von 20×10^6 oder 10×10^6 OT1 CD8+ T Zellen. Erst mit verringerter Anzahl der transferierten Zellen stieg die Überlebensrate bei den weiblichen Empfängertieren an. So wurde durch den Transfer von 4×10^6 OT1 CD8+ T Zellen eine Überlebensrate von 70% und durch den Transfer von 3×10^6 OT1 CD8+ T Zellen eine 100%ige Überlebensrate bis Tag 14 nach Transfer erreicht (Abb.4). Die männlichen Empfängertiere wiesen unabhängig von der transferierten Zellzahl keine erhöhte Sterblichkeitsrate nach Zelltransfer bis zum Ende des Beobachtungszeitraums von 14 Tagen auf. Die erhöhte Sterblichkeitsrate der weiblichen K14OVAp Tiere nach Zelltransfer lässt darauf schließen, dass die K14OVAp Weibchen suszeptibler auf den Transfer der OT1 CD8+ T Zellen reagierten.

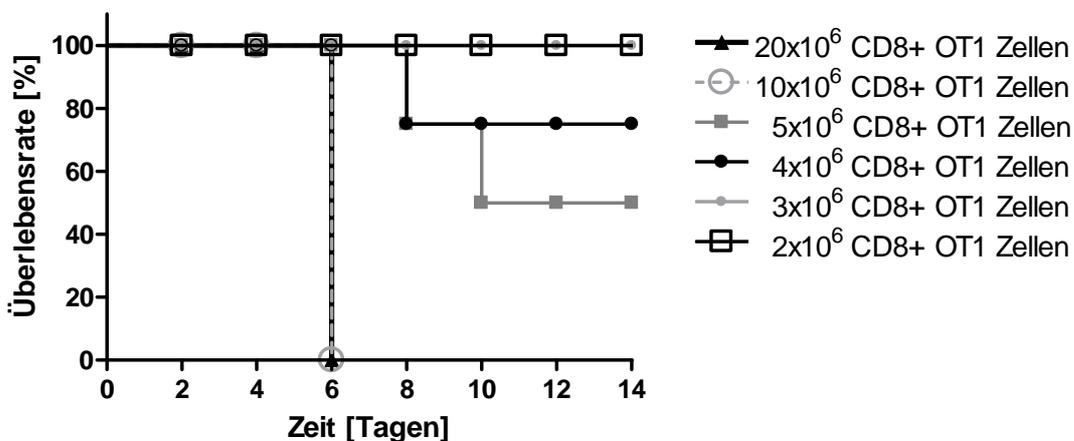


Abb.4) Überlebensrate der weiblichen K14OVAp Empfängertiere in Prozent nach Transfer von (\blacktriangle) 20×10^6 , (\bigcirc) 10×10^6 , (\blacksquare) 5×10^6 , (\bullet) 4×10^6 , (\circ) 3×10^6 oder (\square) 2×10^6 OT1 CD8+ Zellen über einen Zeitraum von 14 Tagen.

Um festzustellen, ob sich die erhöhte Empfänglichkeit der weiblichen Tiere auch in einer veränderten Leberschädigung der K14OVAp Weibchen im Vergleich zu den K14OVAp Männchen auswirkte, wurden die Serumtransaminasen der Tiere im Verlauf mehrerer Tage nach Zelltransfer bestimmt. Hierfür wurden nach Zelltransfer die K14OVAp Empfängertiere an unterschiedlichen Tagen getötet und das Blut zur Serumgewinnung entnommen. Bei den weiblichen K14OVAp Empfängertieren zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Transaminasenwerte ab Tag 8 nach Zelltransfer von 4×10^6 OT1 CD8+ T Zellen, im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche PBS anstelle von OT1 T Zellen erhalten hatten (* $p < 0,05$, ** $p < 0,009$). Bei den männlichen K14OVAp Empfängertieren zeigte sich, auch bei mehr als doppelt so hoher Anzahl an transferierten Zellen (10×10^6 OT1 CD8+ T Zellen), kein signifikanter Anstieg der Serumtransaminasen im zeitlichen Verlauf im Vergleich zu ihrer PBS behandelten Kontrollgruppe (Abb.5). Somit induzierte der OT1 CD8+ T Zelltransfer in den weiblichen K14OVAp Tiere im zeitlichen Verlauf einen Anstieg der Serumtransaminasen, während die männlichen K14OVAp Tiere, trotz doppelt so hoher Menge an transferierten OT1 CD8+ T Zellen, keinen Anstieg der Serumtransaminasen aufwiesen.

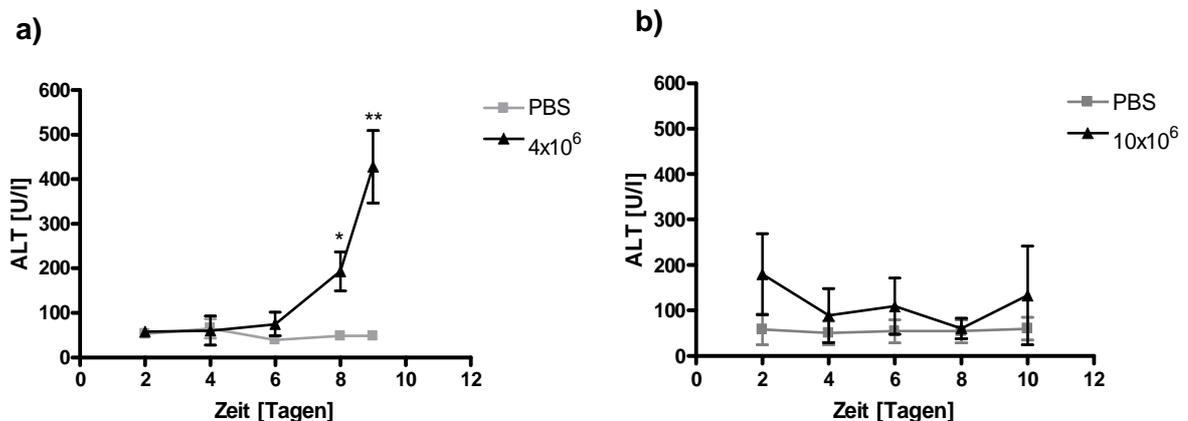


Abb.5) Serumtransaminasen (ALT in U/l) in weiblichen und männlichen K14OVAp Tieren nach Transfer von OT1 CD8+ T Zellen. (a) Serumtransaminasen der weibliche K14OVAp Empfängertiere nach Transfer von 4×10^6 OT1 CD8+ T Zellen oder PBS als Kontrolle (* $p < 0,05$, ** $p < 0,009$). (b) Serumtransaminasen der männlichen K14OVAp Empfängertiere nach Transfer von 10×10^6 OT1 CD8+ T Zellen oder PBS als Kontrolle.

Um den Unterschied in der Erhöhung der Serumtransaminasen zwischen den männlichen und weiblichen K14OVAp Empfängertieren weiter zu validieren, wurden beiden Geschlechtergruppen die gleiche Anzahl von 4×10^6 OT1 CD8+ T Zellen transferiert und die Tiere an Tag 9 nach Zelltransfer getötet. Die weiblichen K14OVAP Tiere wiesen nach

OT1 CD8+ T Zelltransfer deutlich erhöhte Transaminasenwerte auf. Bei den männlichen K14OVAp Tieren konnte hingegen keine Erhöhung der Transaminasenwerte festgestellt werden. Im direkten Vergleich wiesen die weiblichen K14OVAp Empfängertiere signifikant erhöhte Transaminasenwerte im Vergleich zu den männlichen K14OVAp Empfängertieren auf (** $p < 0,0002$) (Abb.6). Da erhöhte Serumtransaminasen eine Zellschädigung von Hepatozyten widerspiegeln, ließen die erhöhten Werte der weiblichen Empfängertiere auf eine verstärkte Leberschädigung im Vergleich zu der männlichen Gruppe schließen.

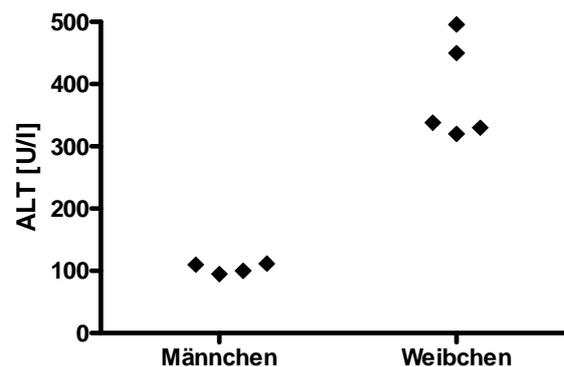


Abb.6) Transaminasenwerte (ALT in U/l) männlicher und weiblicher K14OVAp Empfängertiere 9 Tage nach Transfer von 4×10^6 OT1 CD8+ T Zellen ($p < 0,0002$).**

Um zu überprüfen, ob bei den weiblichen K14OVAp Tieren tatsächlich auch eine verstärkte Leberschädigung im Vergleich zu den männlichen K14OVAp Tieren vorlag, wurden histologische Schnitte der Lebern der K14OVAp Tiere nach CD8+ OT1 T Zelltransfer angefertigt. Eine H&E Färbung zur Ermittlung des Entzündungsgrades wurde durchgeführt (Abb.7a) und die Schnitte verblindet von einem Pathologen nach Scheuer bewertet. Es zeigte sich, dass die weiblichen K14OVAp Tiere nach OT1 CD8+ T Zelltransfer, entsprechend ihrer Transaminasenwerte, einen deutlich erhöhten Pathologiescore im Vergleich zu den männlichen Tieren und den jeweiligen PBS behandelten Kontrollgruppen aufwiesen. So zeigten die weiblichen K14OVAp Tiere nach OT1 CD8+ T Zelltransfer eine deutliche Entzündung, gekennzeichnet durch peribiliäre und periportale Infiltrate, sowie Endothelitis (Abb.7d). Die männlichen Tiere hingegen waren zum größten Teil histologisch unauffällig (Abb.7c). In der Leber zeigte sich somit, dass der Transfer von OT1 CD8+ T Zellen in den weiblichen Tieren eine histologisch nachweisbare portale Entzündung induzierte, welche zu einer Erhöhung von Serumtransaminasen führte. Hingegen schien der OT1 CD8+ T Zelltransfer keine Leberpathologie in männlichen K14OVAp Tiere zu bewirken.

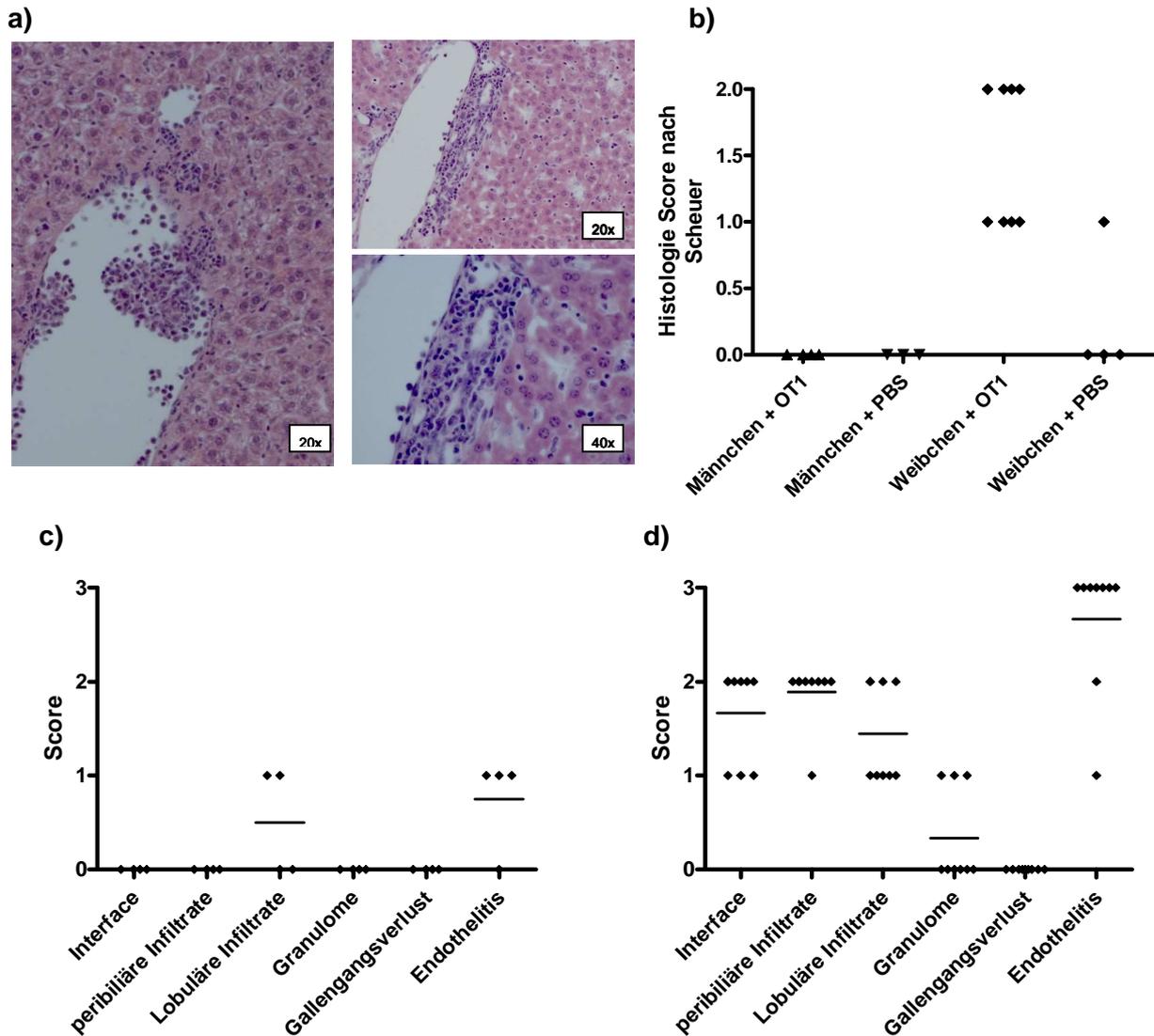


Abb.7) Histologischer Nachweis der Leberschädigung im K14OVAp Modell (a) H&E Färbung von Leberschnitten der K14OVAp Weibchen 9 Tage nach Transfer von 4×10^6 OT1 CD8+ T Zellen (b) Histologie Score nach Scheuer: 0= histomorphologisch kein PBC Anhalt, 1= Cholangitis, 2= Periductuläre Reaktion, Peribiliäre lymphozytäre Entzündung. (c) K14OVAp Männchen nach Transfer von 4×10^6 OT1 CD8+ T Zellen, sowie (d) K14OVAp Weibchen nach Transfer von 4×10^6 OT1 CD8+ T Zellen.

Es stellte sich nun die Frage, ob die Entzündungsunterschiede in weiblichen und männlichen Empfängertieren organspezifisch für die Leber sind oder auch weitere Organe betreffen, in denen das Antigenpeptid exprimiert wird. Das Antigenpeptid der K14OVAp Maus wird als Transgen unter der Kontrolle des humanen Keratinozyten-spezifischen Promotors (K14) exprimiert, welcher in epithelialen Zellen des Thymus, sowie der Haut, des Ösophagus und der Zunge aktiv ist [127]. Daher wurden histologische Schnitte dieser Organe nach H&E Färbung zur Ermittlung des Entzündungsgrades verblindet von einem

Pathologen bewertet. An Tag 8 nach Zelltransfer zeigte sich eine leichte Entzündung des Ösophagus, sowie vereinzelte Infiltrate in der Haut und der Zunge der Empfängertiere. Zwischen den männlichen und weiblichen Empfängertieren konnten jedoch keine Unterschiede im Entzündungsgrad dieser Organe festgestellt werden (Abb. nicht gezeigt). Dies lässt darauf schließen, dass sich die Unterschiede in der Entzündungsreaktion nach Zelltransfer zwischen männlichen und weiblichen K14OVAp Tieren nur organspezifisch für die Leber zeigen.

Neben den Serumtransaminasen sind anti-mitochondriale Antikörper (AMAs) ein weiteres wichtiges Kriterium zur Krankheitsdiagnose der PBC oder zeigen ein erhebliches Risiko an, innerhalb der kommenden 10-15 Jahre an PBC zu erkranken. Das Serum weiblicher K14OVAp Empfängertiere nach OT1 CD8+ Zelltransfer wies zu 50% AMA Spiegel über den Schwellenwert des Tests von 30 RE/ml auf. Bei den männlichen Tieren konnte hingegen keine Erhöhung des AMA Spiegel gemessen werden (Tab.1).

	Anzahl gesamt	> 30 RE/ml	<30 RE/ml	%
K14Ovap ♀	16	8 (40-160)	8	50
K14Ovap ♂	8	0	8	0

Tab.1) AMA Messung im Serum von K14OVAp Weibchen und K14OVAp Männchen. Positiver Schwellenwert liegt bei 30 RE/ml.

3.1.1 Rekrutierung der transferierten Zellen

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass der Transfer von OT1 CD8+ T Zellen geschlechts- und organspezifische Unterschiede in den männlichen und weiblichen K14OVAp Tieren induzierte. Es stellte sich nun die Frage, ob Unterschiede in der Rekrutierung der transferierten OT1 CD8+ T Zellen in die Lebern der männlichen und weiblichen K14OVAp Tiere hierfür verantwortlich sind. Durch Kreuzung der OT1 transgenen Tiere mit B6.SJL/BoyJ Tieren wurden Tiere generiert, welche neben dem spezifischen OVA Rezeptor auf ihren CD8 Zellen zusätzlich konstitutiv das kongene CD45.1 Allel exprimieren (Abb.8 a und b). Anhand des an der Zelloberfläche exprimierten CD45.1 Allels war es nun möglich, transferierte OT1 CD8+CD45.1+ T Zellen in den Empfängertieren nach Transfer zu detektieren und diese von den endogenen CD8+CD45.2+ T Zellen zu unterscheiden. Hierzu wurden aus den K14OVAp Empfängertieren nach OT1 CD8+CD45.1+ T Zelltransfer zu unterschiedlichen Zeitpunkten Leber- und Milzzellen isoliert und die CD8+ T Zellen, sowie das CD45.1 Allel der transferierten Zellen angefärbt. Die Bestimmung der prozentualen Zellzahlen erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

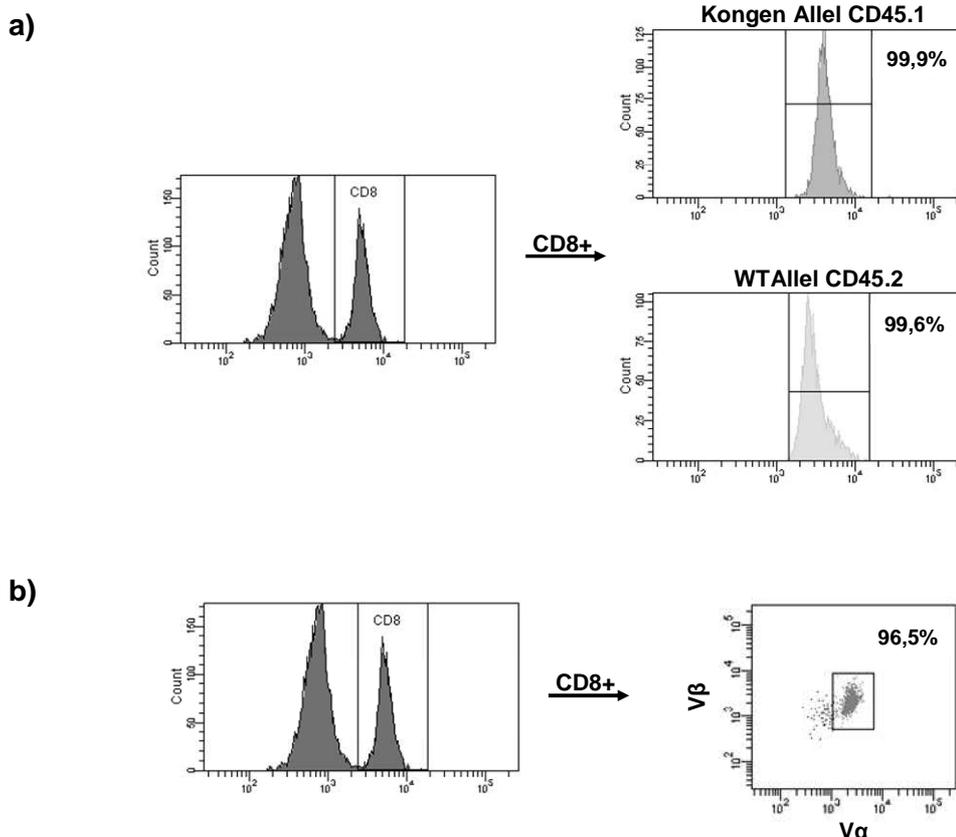


Abb.8) (a) Expression des CD45.1 Allels auf CD8 T Zellen der OT1xB6.SJL/BoyJ Maus.

(b) Expression des transgenen OVAp Rezeptors auf CD8 T Zellen der OT1xB6.SJL/BoyJ Maus

An Tag 1, Tag 3 und Tag 5 nach Zelltransfer konnten keine Unterschiede in der prozentualen Anzahl der CD8+CD45.1+ T Zellen in den Milz und Leberzellen zwischen männlichen und weiblichen K14OVAp Empfängertieren festgestellt werden. An Tag 8 nach Zelltransfer stieg der Anteil der CD8+CD45.1+ T Zellen in der Milz und der Leber deutlich an im Vergleich zu Tag 5. Unterschiede zwischen den männlichen und weiblichen Empfängertieren waren jedoch nicht zu verzeichnen (Abb.9). Dies deutet darauf hin, dass die geschlechtsabhängigen Unterschiede der portalen Entzündung nicht durch unterschiedliches Überleben der transferierten Zellen oder deren unterschiedliche Rekrutierung in die Leber der Empfängertiere erklärt werden kann.

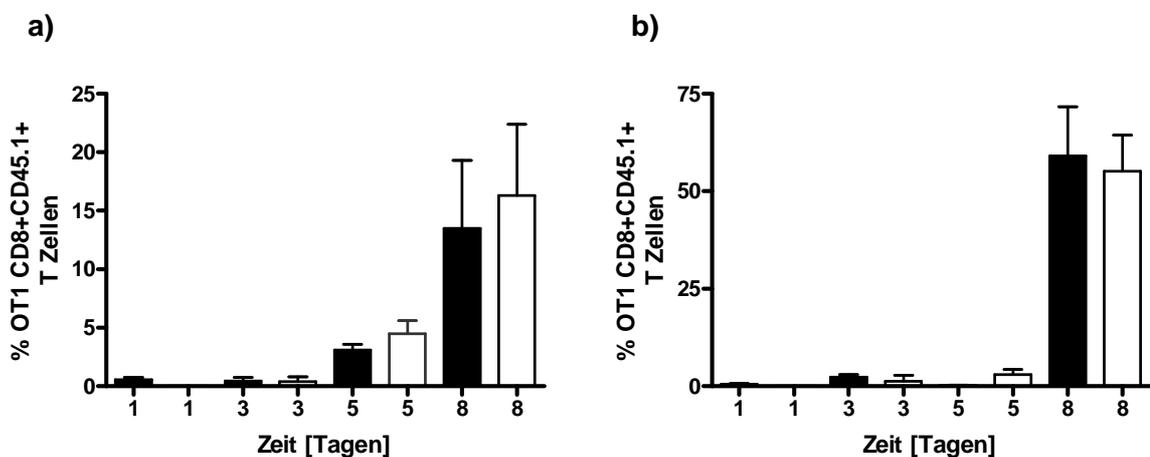


Abb.9) Anzahl der CD8+CD45.1+ OT1 T Zellen in der (a) Milz und (b) Leber von männlichen (schwarz) und weiblichen (weiß) K14OVAp Empfängertieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfer von 4×10^6 CD8+CD45.1+ OT1 T Zellen.

3.1.2 Regulatorische T Zellfunktionen

Da die Rekrutierung der transferierten CD8⁺ OT1 T Zellen in die Leber bei männlichen und weiblichen K14OVAp Tieren gleich ist, wurde untersucht, ob die Unterschiede der Leberentzündung bei männlichen und weiblichen K14OVAp Empfängertieren auf unterschiedlichen regulatorischen Funktionen von Immunzellen beruhen, welche eine entzündungsdämpfende Rolle haben. Die Gruppe um Alvarez fand heraus, dass in einem Mausmodell der Autoimmunen Hepatitis die Anzahl der regulatorischen T Zellen in den weiblichen Tieren signifikant verringert war im Vergleich zu den männlichen Tieren. Auch hier zeigte sich eine deutlich schlechtere Krankheitsprognose der weiblichen Tiere [128]. Um die Rolle der regulatorischen T Zellen im Mausmodell der portalen Entzündung zu untersuchen, wurden Lymphozyten aus der Milz und der Leber isoliert und anschließend mittels Durchflusszytometrie auf die Anzahl der regulatorischen T Zellen hin analysiert. Hierzu wurden die Zellen anhand der Oberflächenmarker CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺, sowie des Transkriptionsfaktors FOXP3⁺ untersucht.

Nach Transfer der CD8⁺ OT1 T Zellen zeigte sich eine verminderte Anzahl der regulatorischen Zellen an der gesamten Lymphozytenpopulation in der Milz, sowohl bei den männlichen (**p=0,0001), wie auch bei den weiblichen K14OVAp Empfängertieren (**p=0,0001) im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche anstelle der CD8⁺ OT1 T Zellen PBS erhalten hatten. Zwischen den männlichen und den weiblichen K14OVAp Tieren konnte nach Transfer der CD8⁺ OT1 T Zellen jedoch kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Treg in der Milz verzeichnet werden (Abb.10a). Betrachtet man hingegen den Anteil der Foxp3 exprimierenden CD4⁺ T Zellen in der Milz der K14OVAp Männchen (*p=0,0112) und Weibchen (*p=0,0133), so war dieser nach CD8⁺ OT1 T Zelltransfer signifikant erhöht im Vergleich zur jeweiligen PBS Kontrollgruppe. Die männlichen und weiblichen K14OVAp Tiere nach CD8⁺ OT1 T Zelltransfer wiesen im direkten Vergleich jedoch keine Unterschiede in der Foxp3 Expression in der Milz auf (Abb.10b).

In der Leber zeigte sich ebenfalls eine verminderte Anzahl der regulatorischen Zellen an der gesamten Lymphozytenpopulation, sowohl bei den männlichen (**p=0,0007), wie auch bei den weiblichen K14OVAp Empfängertieren (**p=0,0001) im Vergleich zur jeweiligen PBS Kontrollgruppe. Zwischen den männlichen und den weiblichen K14OVAp Tieren konnte nach CD8⁺ OT1 T Zelltransfer kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der gesamten Treg Anzahl verzeichnet werden (Abb.10c). Auch der Anteil der Foxp3 exprimierenden CD4⁺ T Zellen in der Leber war in den K14OVAp Männchen und Weibchen nach CD8⁺ OT1 T Zelltransfer im Vergleich zu ihrer jeweiligen PBS Kontrollgruppe nicht signifikant verändert. Ebenso wies der Anteil der Foxp3 Expression der CD4⁺ Leberlymphozyten der männlichen und weiblichen K14OVAp Tiere nach CD8⁺ OT1 T Zelltransfer im direkten Vergleich keine Unterschiede auf (Abb.10d). Somit war die

Anzahl der regulatorische T Zellen und der Anteil der Foxp3 Expression der CD4+ Milzzellen und Leberlymphozyten in den männlichen und weiblichen K14OVAp Empfängertieren nach CD8+ OT1 T Zelltransfer nicht signifikant verändert.

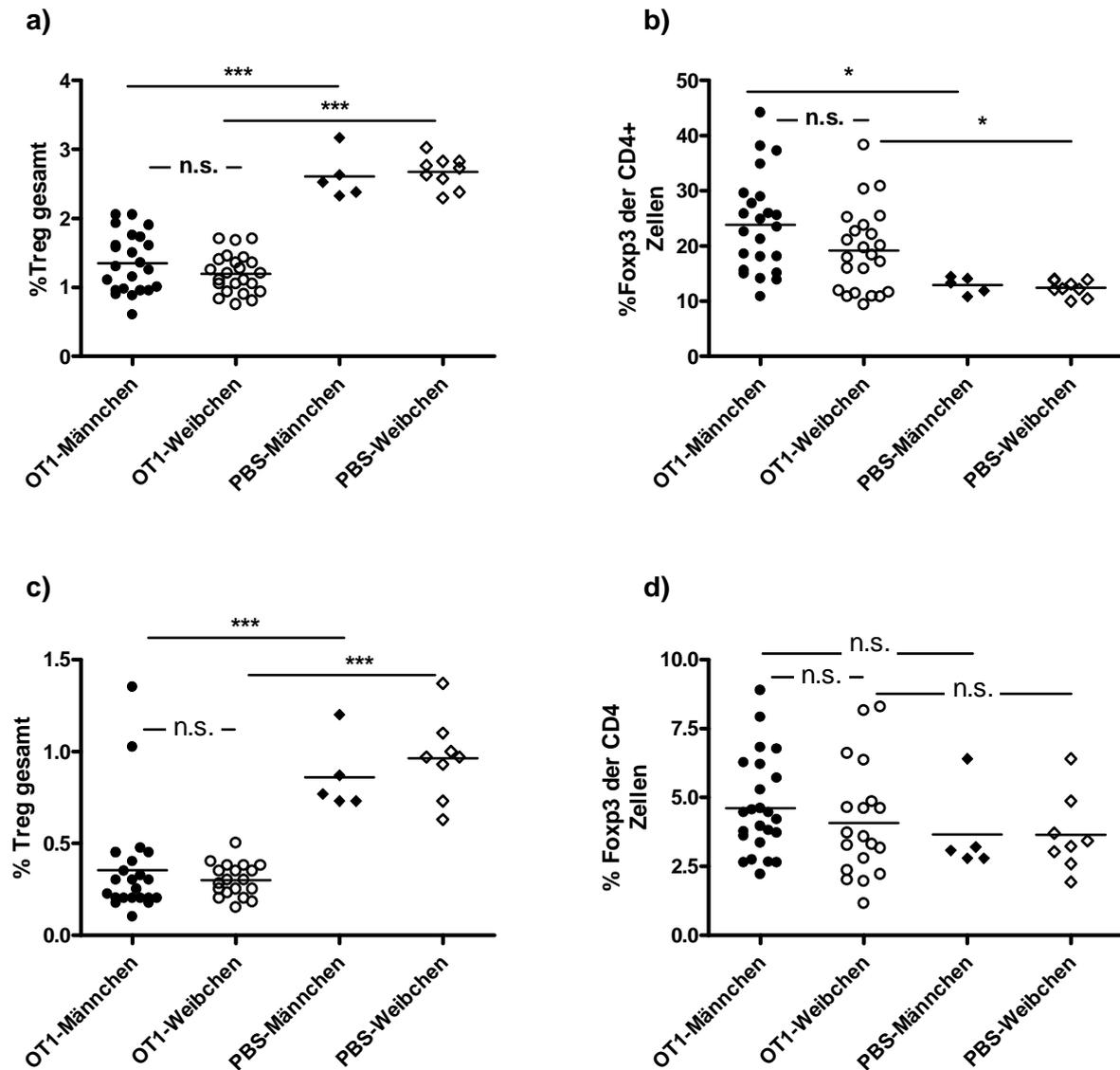


Abb.10) Durchflusszytometrische Bestimmung der Anzahl regulatorischer T Zellen männlicher K14OVAp (schwarze Punkte) und weiblicher K14OVAp (weiße Punkte) Tiere nach CD8+ OT1 T Zelltransfer im Vergleich zu PBS behandelten K14OVAp Männchen (schwarze Raute) und PBS behandelten K14OVAp Weibchen (weiße Raute) (a) Anteil der CD4+CD25+Foxp3+ Zellen an der gesamten Lymphozytenpopulation der Milz. (b) Anteil der Foxp3+ Expression der CD4+ Zellen in der Milz. (c) Anteil der CD4+CD25+Foxp3+ Zellen an der gesamten Lymphozytenpopulation der Leber. (d) Anteil der Foxp3+ Expression der CD4+ Zellen in der Leber (***) $p < 0,0001$; *) $p < 0,0133$).

3.1.3 T Zell Effektorfunktionen

Da sowohl die Rekrutierung der transferierten CD8⁺ OT1 T Zellen in die Leber bei männlichen und weiblichen K14OVAp Tieren gleich zu sein schien und auch keine Unterschiede in der Anzahl der regulatorischen Zellen festgestellt werden konnte, wurde untersucht, ob die Unterschiede der Leberentzündung zwischen männlichen und weiblichen K14OVAp Empfängertieren auf unterschiedlichen Effektorfunktionen der T Zellen in Leber und Milz beruhen. Hierfür wurden OT1 CD8⁺ T Zellen in K14OVAp Männchen und Weibchen transferiert und die Zellen nach 8 Tagen isoliert. Es folgte eine antigenunspezifische Restimulation der Leberlymphozyten und der Milzzellen. Nach 24 Stunden wurden die Überstände geerntet und die IFN γ Spiegel per ELISA ermittelt. Die von Milzzellen sezernierte IFN γ Menge unterschied sich nicht zwischen männlichen und weiblichen K14OVAp Tieren. Die restimulierten Leberlymphozyten der männlichen K14OVAp Tiere sezernierten jedoch signifikant höhere Mengen an IFN γ verglichen mit den restimulierten Leberlymphozyten der weiblichen K14OVAp Tiere (**p=0,0038) (Abb.11). Somit unterscheiden sich die Effektorfunktionen der männlichen und weiblichen K14OVAp Tiere nach CD8⁺ OT1 T Zellentransfer in der erhöhten Sekretion von IFN γ durch Leberlymphozyten männlicher K14OVAp Tiere.

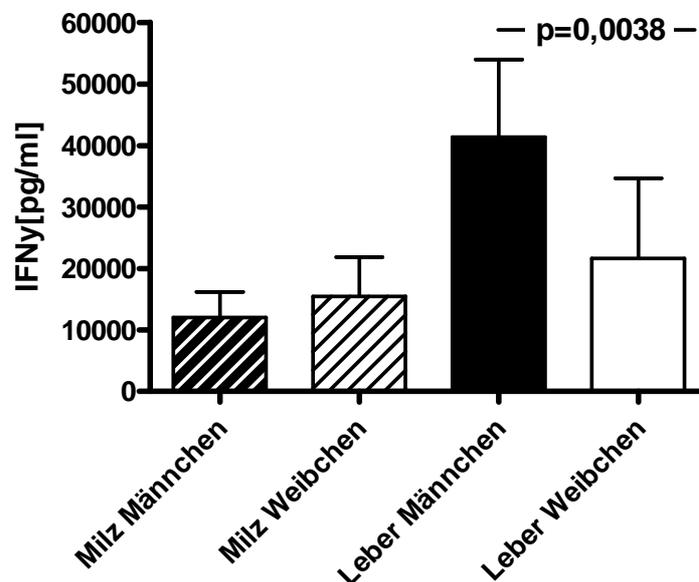


Abb.11) ELISA Messung von IFN γ nach Restimulation von Milzzellen (schraffiert) oder Leberzellen (unschraffiert) mit aCD3/aCD28 an Tag 8 nach Transfer von 4×10^6 OT1 CD8⁺T Zellen. Dargestellt ist die Menge an sezerniertem IFN γ in pg/ml der K14OVAp Männchen (schwarz schraffiert) und K14OVAp Weibchen (weiß schraffiert) (**p<0,0038).

Um genauer zu verifizieren, welche der Immunzellen hierbei vermehrt IFN γ ausschütten, wurden die isolierten Leberlymphozyten und Milzzellen mit PMA/Ionomycin restimuliert und eine Oberflächenfärbung, sowie eine intrazelluläre Färbung durchgeführt. Es zeigte sich, dass die CD8 $^+$ T Zellen, die CD4 $^+$ T Zellen und die NKT Zellen der Milz bei männlichen und weiblichen K14OVAp Tieren zu gleiche Anteilen IFN γ sekretierten (Abb.12). Die CD8 $^+$ T Zellen der Leber wiesen bei K14OVAp Männchen einen signifikant höheren Anteil an IFN γ produzierenden Zellen auf als bei K14OVAp Weibchen (**p=0,0006). Der Anteil der IFN γ produzierenden CD4 $^+$ Leberlymphozyten aus männlichen und weiblichen Tiere war gleich hoch. Der Anteil der IFN γ sekretierenden NKT Zellen der männlichen K14OVAp Leberlymphozyten war hingegen wieder signifikant höher, verglichen mit den Leberlymphozyten der weiblichen K14OVAp Tiere (**p=0,0001) (Abb.12). Somit zeigte sich, dass die CD8 $^+$ und die NKT Leberlymphozyten der männlichen Tiere zu einem höheren Anteil IFN produzierten, verglichen mit den Leberlymphozyten aus den weiblichen K14OVAp Tieren. Dieses Ergebnis deckt sich mit den signifikant höheren IFN γ Mengen im ELISA der restimulierten Leberlymphozyten der männlichen K14OVAp Tiere.

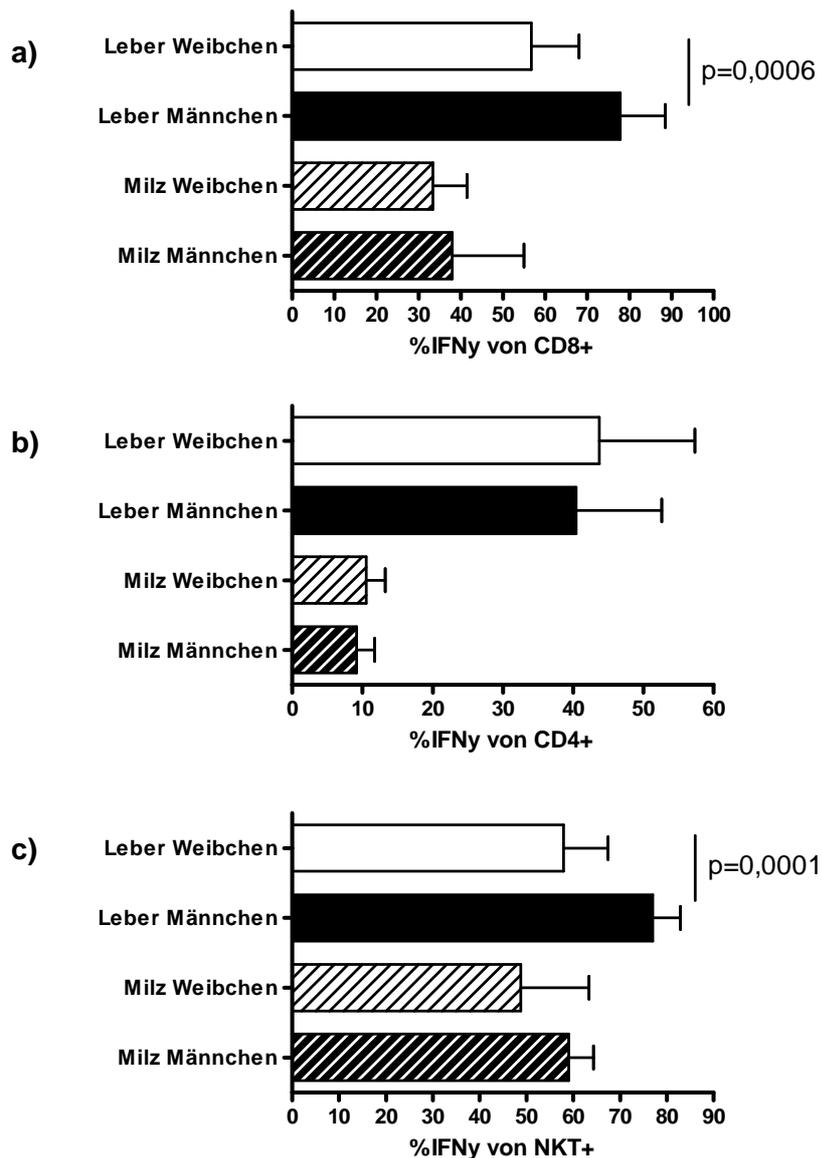
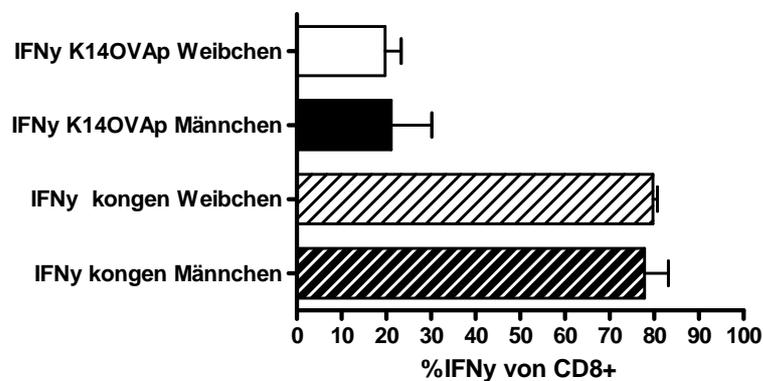


Abb.12) Durchflusszytometrische Bestimmung der intrazellulären IFN γ Produktion
Vergleich der IFN γ produzierenden (a) CD8+ T Zellen, (b) CD4+ T Zellen und (c) NKT Zellen
aus Milz (schraffierte Balken) oder Leber (gefüllte Balken) männlicher (schwarz) und
weiblicher (weiß) K14OVAp Tiere (p<0,0006).**

Der Anteil der IFN γ produzierenden CD8+ Leberlymphozyten der männlichen K14OVAp Tiere war signifikant erhöht im Vergleich zu dem der weiblichen K14OVAp Tiere. Durch Verwendung von CD8+CD45.1+ OT1 T Zellen war es möglich, die Effektorfunktionen der transferierten CD8+CD45.1+ OT1 T Zellen von denen der endogenen CD8+CD54.2+ T Zellen der K14OVAp Empfängertiere zu unterscheiden. Es zeigte sich, dass der Anteil der IFN γ bildenden CD8+CD45.1+ OT1 Milzzellen bei männlichen und weiblichen K14OVAp Tieren gleich hoch war. Auch der Anteil an IFN γ bildenden CD8+CD45.2+ Milzzellen war bei männlichen und weiblichen K14OVAp Tieren gleich hoch. Der Anteil der IFN γ

bildenden CD8+CD45.1+ OT1 T Zellen in der Leber der männlichen und weiblichen K14OVAp Tiere unterschied sich ebenfalls nicht. Hingegen war der Anteil der IFN γ bildenden CD8+CD45.2+ OT1 T Zellen aus den Lebern männlicher K14OVAp Tiere signifikant erhöht im Vergleich zum Anteil der CD8+CD45.2+ OT1 T Zellen aus Lebern der weiblichen K14OVAp Tiere (** $p=0,0016$) (Abb.13). Somit zeigte sich in den männlichen und weiblichen K14OVAp Empfängertieren nach Zelltransfer nur ein Unterschied in den Effektorfunktionen der endogenen CD8+CD45.2+ Leberlymphozyten und nicht in den Effektorfunktionen der transferierten CD8+CD45.1+ OT1 T Zellen.

a)



b)

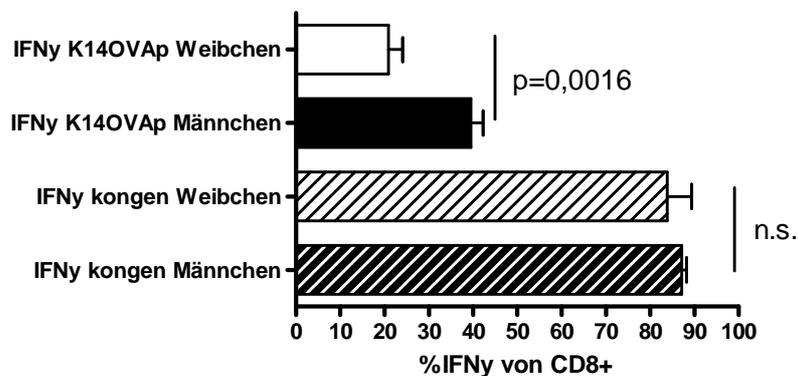


Abb.13) Durchflusszytometrische Bestimmung der IFN γ Bildung durch transferierte CD8+CD45.1+ OT1 T Zellen (schraffiert) im Vergleich zu endogenen CD8+CD45.2+ T Zellen von K14OVAp Tieren (unschraffiert). Dargestellt ist der Anteil der IFN γ bildenden Zellen männlicher K14OVAp Tiere (schwarz) und weiblicher K14OVAp Tiere (weiß) (a) in der Milz und (b) in der Leber (** $p<0,0016$).

3.1.4 Einfluss der Sexualhormone auf die portale Entzündung in K14OVAp Tieren

Nach Analyse der Effektorfunktionen und der regulatorischen Funktion stellte sich weiterhin die Frage, was die geschlechtsabhängigen Unterschiede der portalen Entzündung reguliert. Ein Unterschied zwischen den Geschlechtern besteht darin, dass die Menge an produzierten und freien Sexualhormonen, sowie die Reaktivität des Körpers auf die Sexualhormone, stark variiert. Um einen möglichen Einfluss der Sexualhormone Östrogen und Testosteron auf die geschlechtsspezifischen Unterschiede der Leberentzündung der männlichen und weiblichen K14OVAp Tiere zu untersuchen, wurden männliche K14OVAp Tiere im Alter von 4 Wochen kastriert. Zusätzlich wurde nach Kastration ein Östrogenpellet implantiert, welches konstant eine Hormondosis von 0,36 mg/Tag abgab. Weiblichen K14OVAp Tieren wurde hingegen im Alter von 4 Wochen ein Testosteronpellet implantiert, welches ebenfalls eine definierte Menge an Hormon (1,5 mg/Tag) abgab. 4 Wochen nach Beginn der jeweiligen Hormonbehandlung wurde ein OT1 CD8+ T Zelltransfer durchgeführt und die Tiere an Tag 8 nach Zelltransfer analysiert. Zur Bestimmung der histologischen Entzündung nach Hormongabe und Zelltransfer wurden H&E gefärbte histologische Schnitte zur Ermittlung des Entzündungsgrades der Leber angefertigt und nach einem Entzündungsscore (mHAI) bewertet. Die Kastration und Östrogengabe führte in den männlichen K14OVAp Tieren zu einer deutlichen Entzündung in der Leber im Vergleich zu den nicht vorbehandelten K14OVAp Männchen (**p=0,0011). Die Leberentzündung der mit Testosteron vorbehandelten Weibchen war signifikant geringer im Vergleich zu den nicht vorbehandelten K14OVAp Weibchen (**p=0,0001) (Abb.14). Dies lässt darauf schließen, dass die Hormongabe einen Einfluss auf die geschlechtsabhängigen Unterschiede der portalen Entzündung hat.

den nicht vorbehandelten K14OVAp Weibchen (Abb.15a). Der prozentuale Anteil der CD8+CD45.1+ T Zellen in der Leber der mit Testosteron vorbehandelten K14OVAp Weibchen entsprach ebenfalls dem Anteil der nicht vorbehandelten K14OVAp Weibchen (Abb.15b). Das Ergebnis zeigte, dass die Vorbehandlung mit Hormonen keinen Einfluss auf die Rekrutierung und das Überleben der transferierten CD8+ T Zellen in Leber und Milz hatte und deutet darauf hin, dass die geschlechtsabhängigen Unterschiede der portalen Entzündung dadurch nicht erklärt werden können.

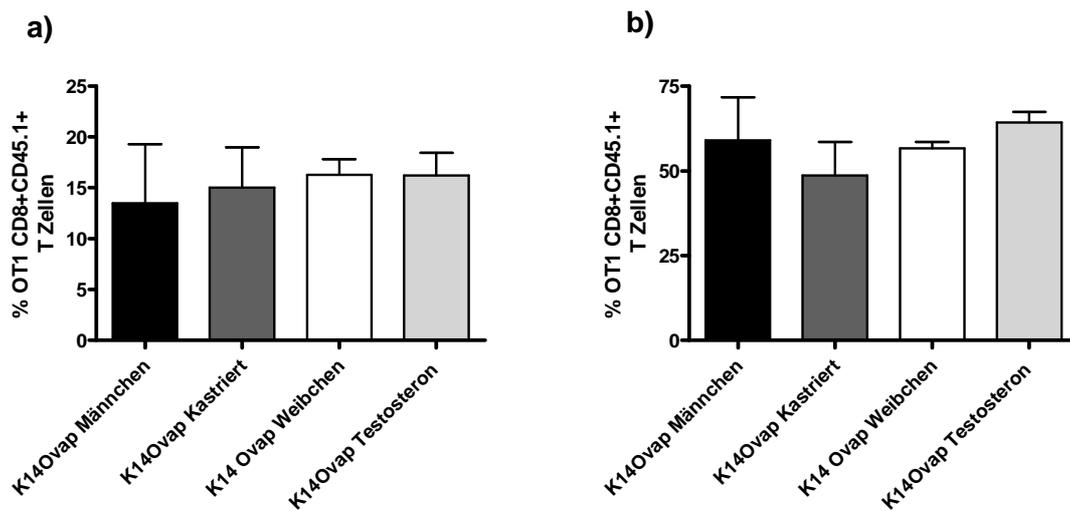


Abb.15) Anzahl der OT1 CD8+CD45.1+ T Zellen in der (a) Milz und (b) Leber an Tag 8 nach Transfer von 4×10^6 OT1 CD8+CD45.1+ T Zellen. Dargestellt sind K14OVAp Männchen (schwarz), kastrierte und mit Östrogen vorbehandelte K14OVAp Männchen (dunkelgrau), K14OVAp Weibchen (weiß), sowie mit Testosteron vorbehandelte K14OVAp Weibchen (hellgrau).

3.1.5 Einfluss von Sexualhormonen auf regulatorische T Zellfunktionen

Da die Hormonvorbehandlung keinen Einfluss auf die Rekrutierung der transferierten Zellen hatte, sollte festgestellt werden, ob die Behandlung mit Hormonen eventuell einen Einfluss auf die Anzahl der regulatorischen T Zellen in Leber und Milz hatte. Hierfür wurden nach OT1 CD8+ T Zelltransfer Lymphozyten aus der Milz und der Leber von kastrierten und mit Östrogen vorbehandelten K14OVAp Männchen und von mit Testosteron vorbehandelten K14OVAp Weibchen isoliert. Anschließend wurde mittels Durchflusszytometrie die Anzahl der regulatorischen T Zellen anhand der Oberflächenmarker CD3+, CD4+, CD25+, sowie des Transkriptionsfaktors FOXP3+ untersucht.

Der Treg Anteil an der gesamten Lymphozytenpopulation in der Milz war bei kastrierten und mit Östrogen vorbehandelten K14OVAp Tieren im Vergleich zu den männlichen nicht vorbehandelten K14OVAp Tieren unverändert. Auch die mit Testosteron vorbehandelten Weibchen wiesen den gleichen Anteil an Tregs in der Milz im Vergleich zu den weiblichen nicht vorbehandelten K14OVAp Tieren auf (Abb.16a). Betrachtet man den Anteil der Foxp3 exprimierenden CD4+ T Zellen in der Milz, so war dieser in den nicht vorbehandelten K14OVAp Männchen im Vergleich zu den kastrierten und mit Östrogen vorbehandelten Tiere signifikant erhöht ($***p=0,0001$). Die Foxp3 Expression der CD4 Milzellen der mit Testosteron vorbehandelten Weibchen im Vergleich zu den nicht vorbehandelten K14OVAp Weibchen war hingegen nicht verändert (Abb.16b).

In der Leber war die Anzahl der regulatorischen Zellen an der gesamten Leberlymphozytenpopulation bei kastrierten und mit Östrogen vorbehandelten K14OVAp Männchen im Vergleich zu den nicht vorbehandelten männlichen K14OVAp Tieren nicht verändert. Auch die mit Testosteron vorbehandelten Weibchen wiesen den gleichen Anteil an gesamt Tregs in der Leber im Vergleich zu den nicht vorbehandelten weiblichen K14OVAp Tieren auf (Abb.16c).

Der Anteil der Foxp3 exprimierenden CD4+ T Zellen in der Leber der nicht vorbehandelten K14OVAp Männchen im Vergleich zu den kastrierten und mit Östrogen vorbehandelten Tiere war gleich. Die Foxp3 Expression der CD4 Leberlymphozyten der mit Testosteron vorbehandelten Weibchen im Vergleich zu den weiblichen K14OVAp Tieren war ebenfalls nicht verändert (Abb.16d). Somit hatte die Vorbehandlung mit Hormonen keinen Einfluss auf die Anzahl der regulatorischen T Zellen und den Anteil der Foxp3 Expression der Leberlymphozyten.

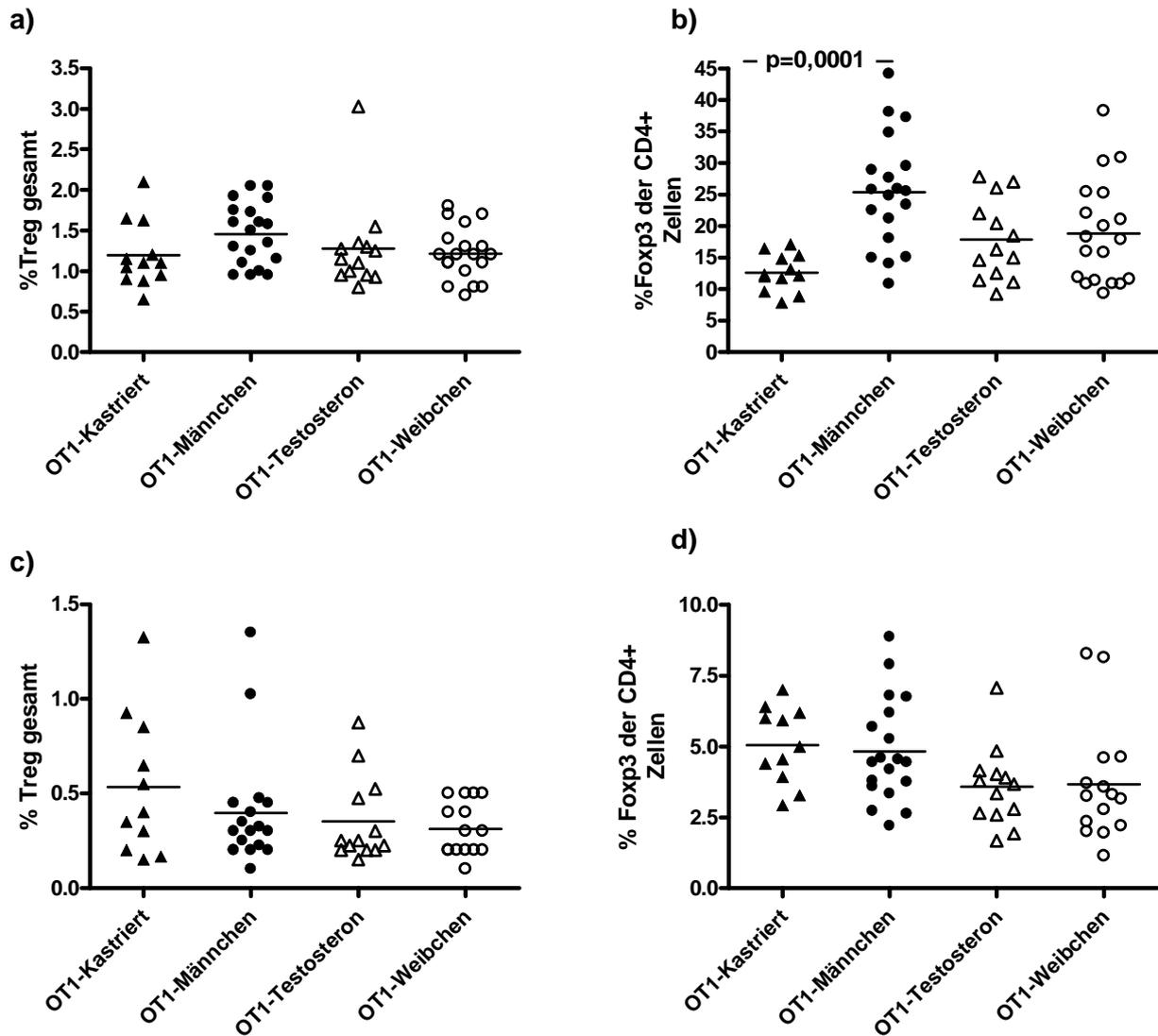


Abb.16) Durchflusszytometrische Bestimmung der Anzahl regulatorischer T Zellen aus nicht vorbehandelten K14OVAp Männchen (schwarze Punkte), kastrierten und mit Östrogen vorbehandelten K14OVAp Männchen (schwarze Dreiecke), nicht vorbehandelten K14OVAp Weibchen (weiße Punkte) und mit Testosteron vorbehandelten K14OVAp Weibchen (weiße Dreiecke) (a) Anteil der CD4+CD25+Foxp3+ Zellen an der gesamten Lymphozytenpopulation der Milz. (b) Anteil der Foxp3+ Expression der CD4+ Zellen in der Milz. (c) Anteil der CD4+CD25+Foxp3+ Zellen an der gesamten Lymphozytenpopulation der Leber. (d) Anteil der Foxp3+ Expression der CD4+ Zellen in der Leber (**p=0,0001).

3.1.6 Einfluss von Sexualhormonen auf T Zelleffektorfunktionen

Da die Hormonvorbehandlung keinen Einfluss auf die Rekrutierung der transferierten CD8+ OT1 T Zellen hatte und auch keine Unterschiede in der Anzahl der regulatorischen Zellen festgestellt werden konnte, sollte festgestellt werden, ob die Behandlung mit Hormonen eventuell einen Einfluss auf die Effektorfunktionen in Leber und Milz hatte. Hierfür wurden einerseits kastrierte und mit Östrogen vorbehandelte K14OVAp Männchen und andererseits mit Testosteron vorbehandelte K14OVAp Weibchen 8 Tage nach Transfer von CD8+CD45.1+ OT1 T Zellen untersucht. Isolierte Milzzellen und Leberlymphozyten wurden mit aCD3/aCD28 stimuliert und die Überstände nach 24 Stunden geerntet und die IFN γ Menge mittels ELISA Messung bestimmt. Die sezernierte IFN γ Menge der Milzzellen aus kastrierten und mit Östrogen vorbehandelten K14OVAp Männchen war im Vergleich zu den Milzzellen aus nicht vorbehandelten K14OVAp Männchen nicht verändert. Auch die mit Testosteron vorbehandelten K14OVAp Weibchen wiesen keine veränderte IFN γ Sekretion durch Milzzellen im Vergleich zu den nicht vorbehandelten K14OVAp Weibchen auf. Die restimulierten Leberlymphozyten aus nicht vorbehandelten K14OVAp Männchen sezernierten jedoch signifikant höhere Mengen an IFN γ , verglichen mit den restimulierten Leberlymphozyten aus kastrierten und mit Östrogen vorbehandelten K14OVAp Männchen (**p=0,0071). Auch die aus der Leber isolierten Lymphozyten der mit Testosteron vorbehandelten Weibchen sezernierten signifikant höhere Mengen an IFN γ im Vergleich zu den nicht vorbehandelten K14OVAp Weibchen (*p=0,0220) (Abb.17). Somit zeigte sich, dass die Hormonvorbehandlung einen Effekt auf die Effektorfunktionen der Leberlymphozyten hatte, indem, im Vergleich zu den jeweils nicht vorbehandelten Kontrolltieren, die Kastration und Östrogengabe bei K14OVAp Männchen die IFN γ Sekretion verringerte und die Testosteron Vorbehandlung bei K14OVAp Weibchen die IFN γ Sekretion erhöhte.

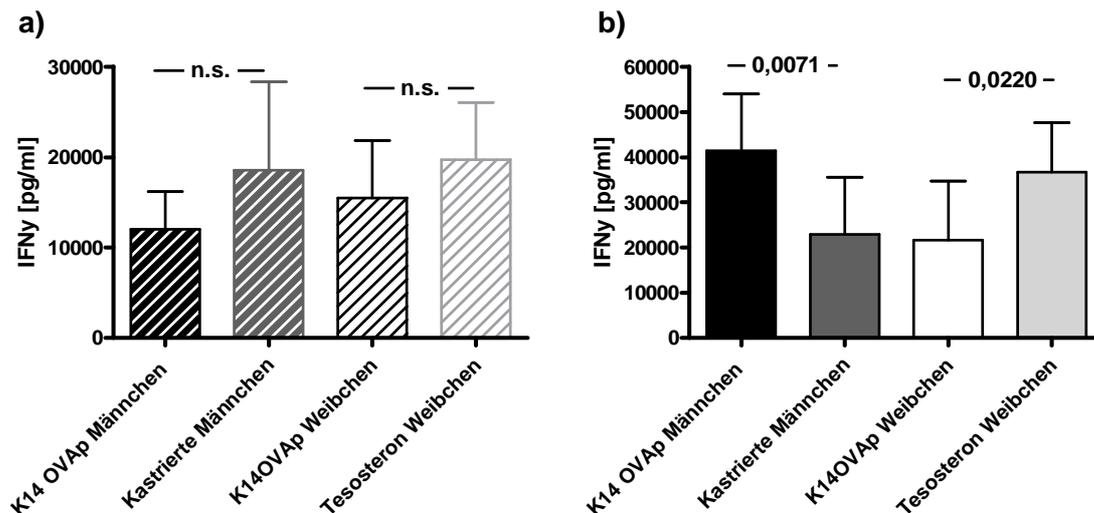


Abb.17) IFN γ Sekretion durch (a) Milzzellen (schrattierte Balken) und (b) Leberlymphozyten (gefüllte Balken) an Tag 8 nach Transfer von OT1 CD8+CD45.1+ T Zellen.

Dargestellt ist die Menge an sezerniertem IFN γ in pg/ml aus nicht vorbehandelten K14OVAp Männchen (schwarz), kastrierten und mit Östrogen vorbehandelten K14OVAp Männchen (dunkelgrau), nicht vorbehandelten K14OVAp Weibchen (weiß) und mit Testosteron vorbehandelten K14OVAp Weibchen (hellgrau) (**p<0,0071;*p<0,0220).

Um genauer zu bestimmen, ob auch die Effektorfunktion der Immunzellen durch die Hormon Vorbehandlung beeinflusst wurden, wurden die isolierten Leberlymphozyten und Milzzellen mit PMA/Ionomycin restimuliert und eine CD8 und NKT Oberflächenfärbung, sowie eine intrazelluläre IFN γ Färbung durchgeführt. Es zeigte sich, dass der Anteil der IFN γ bildenden CD8+ Milzzellen und der Anteil an IFN γ bildenden NKT Milzzellen in den nicht vorbehandelten K14OVAp Männchen und den kastrierten und mit Östrogen vorbehandelten Tieren gleich hoch war. Bei den mit Testosteron vorbehandelten Weibchen war der Anteil an IFN γ bildenden CD8+ T Zellen und der Anteil der IFN γ bildenden NKT Zellen der Milz signifikant höher im Vergleich zu den nicht vorbehandelten K14OVAp Weibchen (*p<0,0158).

Der Anteil der IFN γ bildenden CD8+ Leberlymphozyten der nicht vorbehandelten K14OVAp Männchen war signifikant höher im Vergleich zum Anteil der kastrierten und mit Östrogen vorbehandelten Tiere (**p=0,0057). Ebenso war der Anteil der IFN γ bildenden NKT Zellen der Leber aus nicht vorbehandelten K14OVAp Männchen im Vergleich zum Anteil der kastrierten und mit Östrogen vorbehandelten K14OVAp Tiere signifikant erhöht (*p=0,0419). Der Anteil der IFN γ bildenden CD8+ Leberlymphozyten der nicht vorbehandelten K14OVAp Weibchen war signifikant erniedrigt im Vergleich zum Anteil der mit Testosteron vorbehandelten Tiere (**p=0,0090). Ebenso war auch der Anteil der IFN γ

bildenden NKT Zellen aus der Leber nicht vorbehandelter K14OVAp Weibchen signifikant niedriger im Vergleich zum Anteil der mit Testosteron vorbehandelten K14OVAp Tiere (** $p=0,0006$) (Abb.18a+b). Somit zeigte sich, dass die Hormon Vorbehandlung auch einen Einfluss auf die untersuchten Immunzellen hatte, indem der Anteil der IFN γ bildenden CD8+ und NKT Leberlymphozyten nach Kastration und Östrogengabe bei K14OVAp Männchen geringer und nach Testosteron Vorbehandlung bei K14OVAp Weibchen höher war, im Vergleich zur jeweils nicht vorbehandelten Kontrollgruppe.

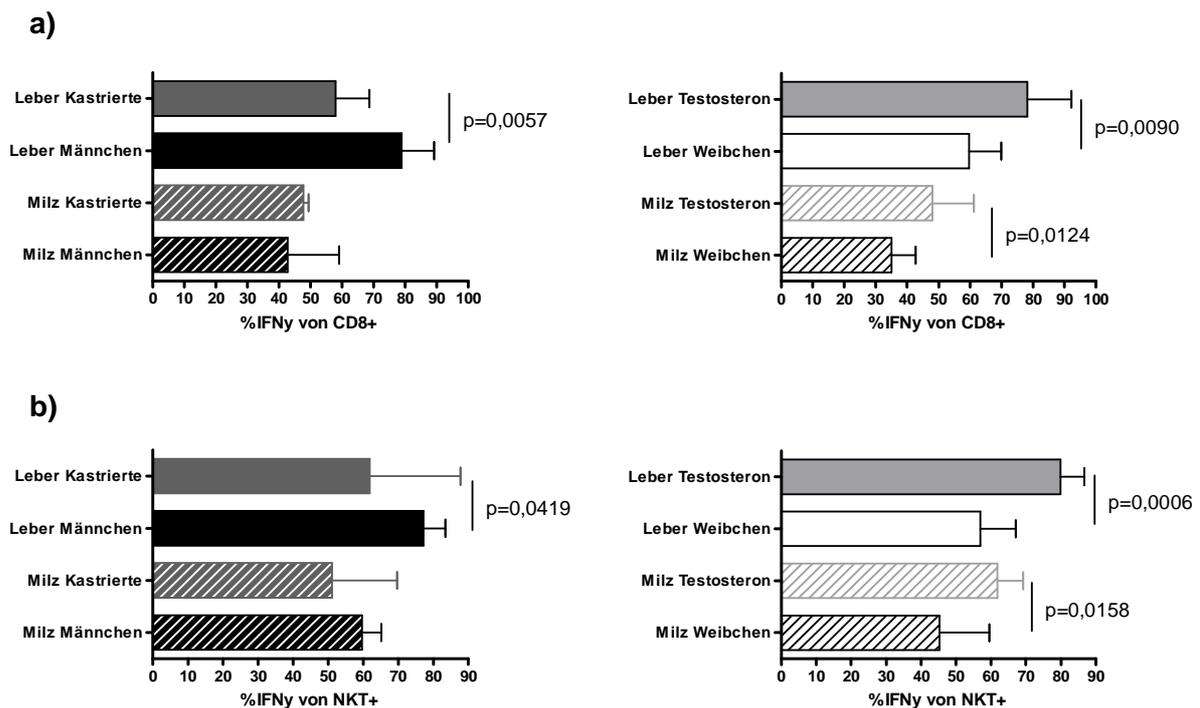


Abb.18) Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils IFN γ produzierender (a) CD8+ T Zellen und (b) NKT Zellen in Milz (schraffierte Balken) und Leber (gefüllte Balken). Dargestellt sind nicht vorbehandelte K14OVAp Männchen (schwarz), kastrierte und mit Östrogen vorbehandelte K14OVAp Männchen (dunkelgrau), nicht vorbehandelte K14OVAp Weibchen (weiß) und mit Testosteron vorbehandelte K14OVAp Weibchen (hellgrau) ($p<0,0006$, ** $p<0,0057$, * $p<0,0158$).**

Neben dem Einfluss der Hormon Vorbehandlung auf die Effektorfunktionen der OT1 CD8+ CD45.1+ T Zellen, wurde auch die Effektorfunktion der endogenen CD8+CD45.2+ T Zellen der K14OVAp Empfängertiere analysiert. Es zeigte sich, dass bei den K14OVAp Männchen im Vergleich zu den kastrierten und mit Östrogen vorbehandelten K14OVAp Tieren der Anteil der IFN γ bildenden CD8+CD45.1+ Milzzellen und der Anteil der IFN γ bildenden CD8+CD45.2+ Milzzellen gleich hoch war. Auch bei den nicht vorbehandelten K14OVAp Weibchen und den mit Testosteron vorbehandelten K14OVAp Weibchen zeigten sich keine Unterschiede im Anteil der IFN γ bildenden CD8+CD45.1+ Milzzellen und dem Anteil der IFN γ bildenden CD8+CD45.2+ Milzzellen (Abb. nicht gezeigt).

Bei isolierten Leberlymphozyten aus unbehandelten K14OVAp Männchen war der Anteil der IFN γ produzierenden CD8+CD45.1+ Zellen signifikant erhöht im Vergleich zu den kastrierten und Östrogen vorbehandelten Männchen (*p=0,015). Ebenso war der Anteil der IFN γ bildenden endogenen CD8+CD45.2+ Leberlymphozyten in den nicht vorbehandelten K14OVAp Männchen signifikant erhöht, verglichen mit den kastrierten und Östrogen vorbehandelten K14OVAp Tieren (**p=0,0082) (Abb.19a). Die isolierten Leberlymphozyten aus unbehandelten K14OVAp Weibchen wiesen signifikant geringere Anteile an IFN γ bildenden CD8+CD45.1+ Zellen im Vergleich zu den mit Testosteron vorbehandelten K14OVAp Weibchen auf (*p=0,0335). Ebenso war der Anteil der IFN γ bildenden endogenen CD8+CD45.2+ Leberlymphozyten in den nicht vorbehandelten K14OVAp Weibchen signifikant niedriger im Vergleich zu den mit Testosteron vorbehandelten K14OVAp Weibchen (**p=0,0096) (Abb.19b). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Hormon Vorbehandlung einen Einfluss auf die Effektorfunktionen der endogenen CD8+CD45.2+, sowie der CD8+CD45.1 Leberlymphozyten hatte. So war der Anteil der IFN γ bildenden CD8+CD45.2+ und der CD8+CD45.1 Leberlymphozyten nach Kastration und Östrogengabe bei K14OVAp Männchen geringer und nach Testosteron Vorbehandlung bei K14OVAp Weibchen höher, im Vergleich zur jeweils nicht vorbehandelten Kontrollgruppe.

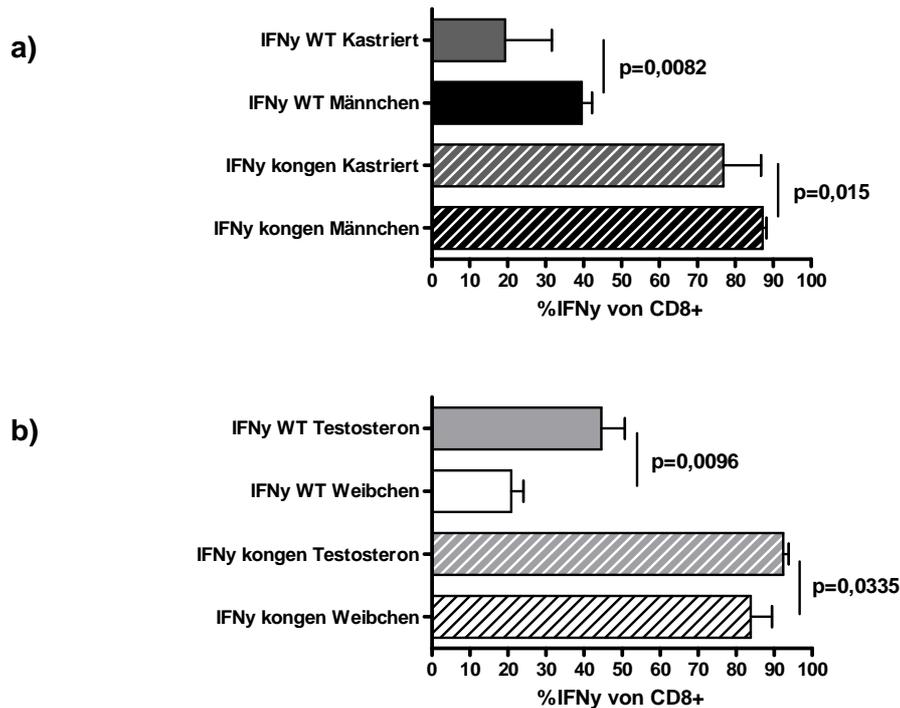


Abb.19) Durchflusszytometrische Bestimmung der IFN γ Bildung durch transferierte OT1 CD8+CD45.1+ T Zellen (schraffiert) im Vergleich zu endogenen CD8+CD45.2+ T Zellen von K14OVAp Tieren (unschraffiert). Dargestellt ist der Anteil der IFN γ bildenden Leberlymphozyten aus (a) nicht vorbehandelten K14OVAp Männchen (schwarz) und kastrierten mit Östrogen vorbehandelten K14OVAp Männchen (weiß) und der Anteil der IFN γ bildenden Leberlymphozyten aus (b) nicht vorbehandelten K14OVAp Weibchen (schwarz) und mit Testosteron vorbehandelten K14OVAp Weibchen (weiß) (p<0,0096, *p<0,0335).**

3.2 MDR2^{-/-} Mausmodell einer primär nicht autoimmun bedingten portalen Entzündung

Neben dem K14OVAp Modell für eine portale antigenabhängige Entzündung, sollte, als weiteres Modell einer primär nicht autoimmun bedingten Entzündung, Tiere der MDR2^{-/-} Linie analysiert werden. Die MDR2^{-/-} Tiere gelten als gut etabliertes Tiermodell einer entzündlich sklerosierenden Cholangitis. Die Tiere entwickeln aufgrund einer gerichteten Deletion des MDR2 (Abcb4) Gens der phospholipid Flipase spontan eine sklerosierende Cholangitis mit makroskopischen und mikroskopischen Eigenschaften der humanen PSC, wie extra- und intrahepatische biliäre Stenose, konzentrische periduktale Fibrose und fokale Obliteration der Gallengänge [36-38]. Um den Grad der Entzündung und den Verlauf der Fibrose in der Leber zu ermitteln, wurden Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten getötet und die Serumtransaminasen bestimmt. Da sich im K14OVAp

Mausmodell deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede zeigten, wurde auch bei der Analyse der MDR2^{-/-} Tiere auf das Geschlecht der untersuchten Tiere geachtet. Es zeigte sich, dass die Transaminasenwerte der weiblichen MDR2^{-/-} Tiere ab einem Tialter von 5 Wochen signifikant im Vergleich zu den männlichen Mdr2^{-/-} Tiere gleichen Alters anstiegen (*p<0,05,**p<0,009,***p<0,007) (Abb.20). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass sich auch im MDR2^{-/-} Modell geschlechtsspezifische Unterschiede in der Entzündungsreaktion der Leber zeigen.

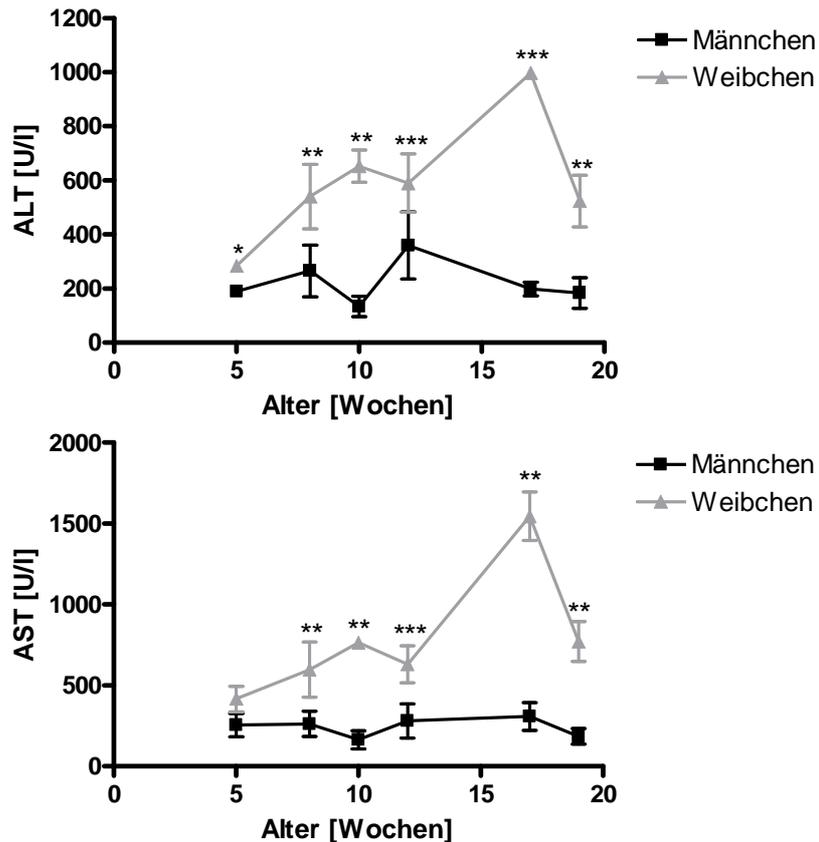


Abb.20 Serumtransaminasen (ALT in U/l) von MDR2^{-/-} Weibchen (graue Linie) im Vergleich zu MDR2^{-/-} Männchen (schwarze Linie) zu verschiedenen Zeitpunkten des Lebensalters in Wochen (*p<0,05,**p<0,009,***p<0,007).

Die erhöhten Transaminasenwerte der weiblichen MDR2^{-/-} ließen auf eine verstärkte Leberschädigung in diesen Tieren im Vergleich zu der männlichen Gruppe schließen. Um dies zu bestätigen wurden histologische Leberschnitte angefertigt und eine H&E Färbung zur Ermittlung des Entzündungsgrades und eine Sirius Rot Färbungen zur Bestimmung der Fibrose Entwicklung angefertigt. Die weiblichen Tiere zeigten deutliche Entzündungen in der Gallengangsumgebung (Abb. 21a). Zudem hatte sich in den weiblichen MDR2^{-/-} Tieren in einem Alter von 17 Wochen eine deutliche konzentrische periduktale Fibrose

entwickelt (Abb. 21b). Auch die männlichen Tiere wiesen deutliche Entzündungsinfiltrate und eine entstehende konzentrische periduktale Fibrose in einem Alter von 17 Wochen auf. Die Ausprägung der Entzündung war in den 17 Wochen alten MDR2^{-/-} Männchen jedoch wesentlich schwächer ausgeprägt als bei weiblichen MDR2^{-/-} Tieren gleichen Alters. Ebenso war auch die Ausprägung der Fibrose in den 17 Wochen alten MDR2^{-/-} Männchen im Vergleich zu weiblichen MDR2^{-/-} Tieren gleichen Alters deutlich geringer (Abb.21). Somit kam das MDR2^{-/-} Modell, neben dem K14OVAp Modell, als weiteres in vivo Modell für die Bearbeitung der Fragestellung dieser Arbeit in Betracht.

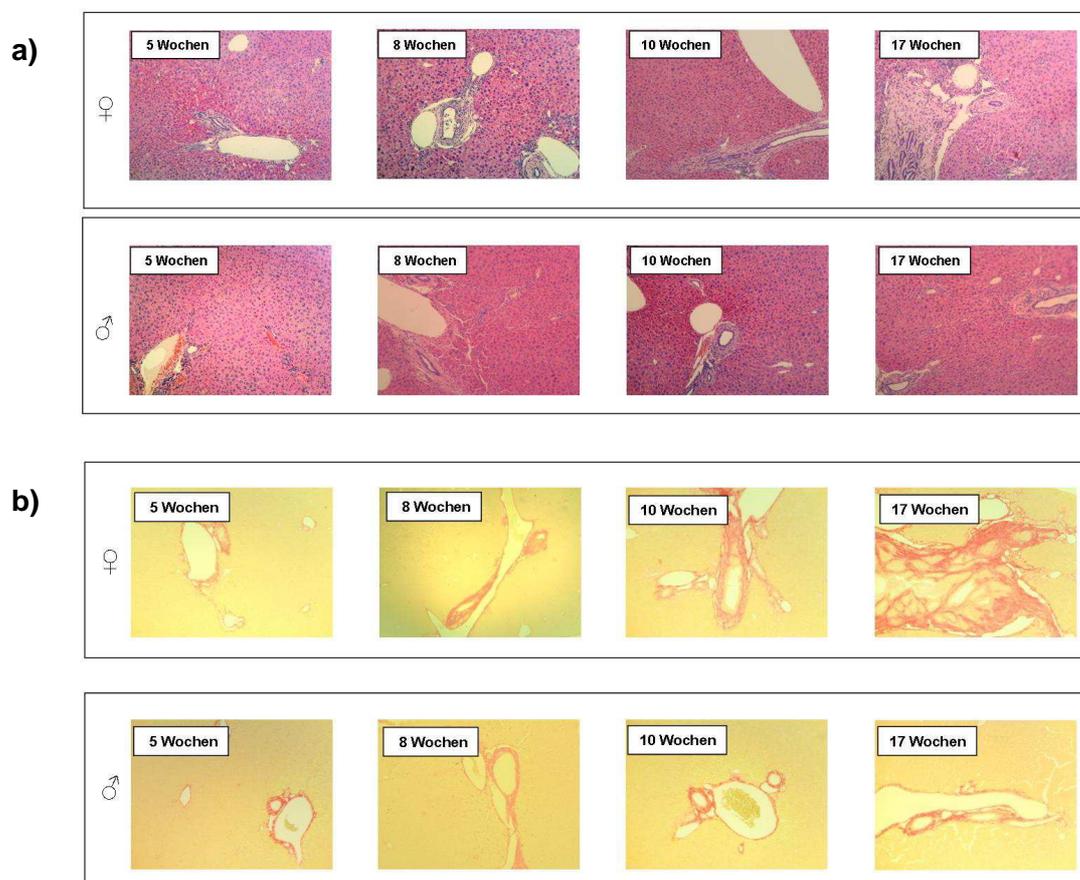


Abb.21) (a) H&E Färbung zur Ermittlung der Entzündung und (b) Sirius Rot Färbung zur Ermittlung des Fibrosegrades in MDR2^{-/-} Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten des Lebensalters in Wochen (10 fache Vergrößerung).

3.3 Wiederherstellung der immunologischen Toleranz in der Leber durch den Transfer von regulatorischen T Zellen (Treg) im MDR2-/- Modell einer primär nicht autoimmun bedingten Leberentzündung

Die Wiederherstellung der immunologischen Toleranz in der Leber durch die Applikation von regulatorischen T Zellen stellt ein attraktives therapeutisches Konzept dar. Aus diesem Grund sollte der Effekt adoptiv transferierter Treg auf die sich spontan entwickelnde sklerosierende Cholangitis in den MDR2-/- Tiere untersucht werden. Hiefür sollten nTreg Zellen aus Spendertieren der WT Linie isoliert werden und adoptiv in MDR2 -/- Empfängertiere transferiert werden. Um auszuschließen, dass es sich bei den transferierten Zellen um aktivierte T Zellen handelte, wurden die isolierten CD4⁺CD25⁺ Zellen auf den regulatorischen T Zellmarker Foxp3 untersucht. Mittels Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass 98,6% der CD4⁺CD25⁺ T Zellen Foxp3 positiv waren (Abb.22).

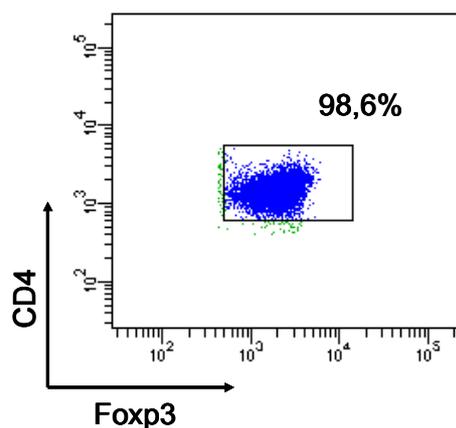


Abb.22) Durchflusszytometrische Bestimmung der Reinheit isolierter nTreg Zellen. Dargestellt ist auf der y-Achse die CD4 Expression und auf der x-Achse die Foxp3 Expression der Zellen.

Den MDR2-/- Tieren wurden, entsprechend des Zelltransferprotokolls (Abb.23), dreimalig im Abstand von zwei Wochen regulatorische T Zellen aus FVB WT Tieren transferiert. Neben der Kontrollgruppe, welcher PBS anstelle von Zellen verabreicht wurde, wurde noch eine weitere Kontrollgruppe eingeführt, welche anstelle der Treg dreimalig 1x10⁶ CD4⁺CD25⁻ Effektorzellen erhielten.

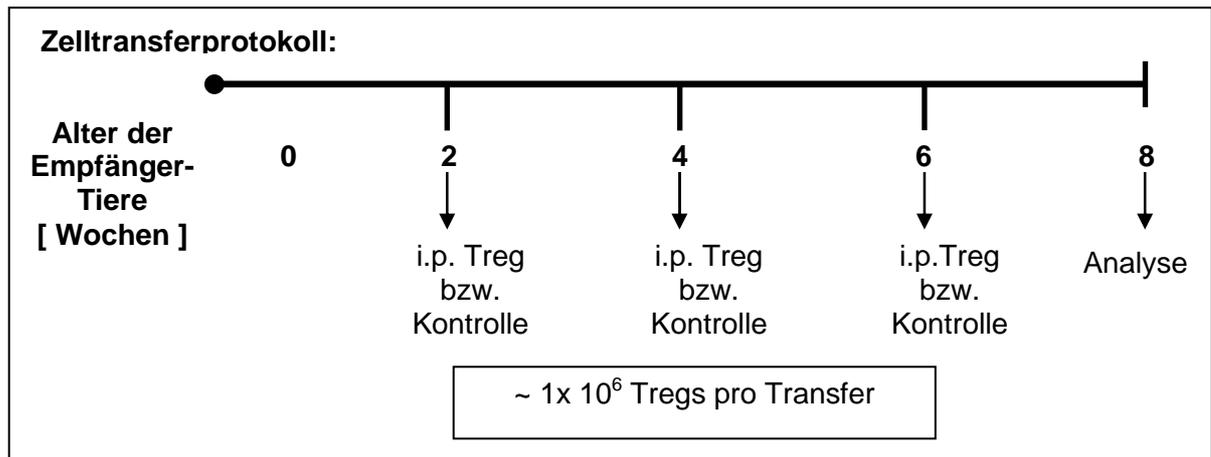


Abb.23) Schema für den FVB- WT Treg Transfer in MDR2^{-/-} Weibchen

Da sich deutliche Unterschiede zwischen der Entzündung und der Fibrose der männlichen und weiblichen Tiere zeigten (siehe Abb.23) wurde bei den Transferversuchen auf ein einheitliches Geschlecht der Empfängertiere geachtet. Aufgrund der gerichteten Deletion gegen das MDR2 (*Abcb4*) Gens wiesen die MDR2^{-/-} Tiere bereits sehr früh eine starke Leberentzündung auf, so dass der erste Treg Transfer bereits im Alter von 2 Wochen durchgeführt wurde. Im Tieralter von 8 Wochen erfolgte die Analyse der Serumtransaminasen der transferierten Tiere und der Kontrollgruppen. Nach dreimaligem FVB Wildtyp Treg Transfer konnte zwischen den Kontrollgruppen und den mit nTreg Zellen transferierten Tieren kein signifikanter Unterschied der Serumtransaminasen festgestellt werden (Abb.24). Das Ergebnis deutet darauf hin, dass der Transfer der FVB Wildtyp nTreg keinen Einfluss auf die entzündliche sklerosierende Cholangitis der MDR2^{-/-} Tiere hatte.

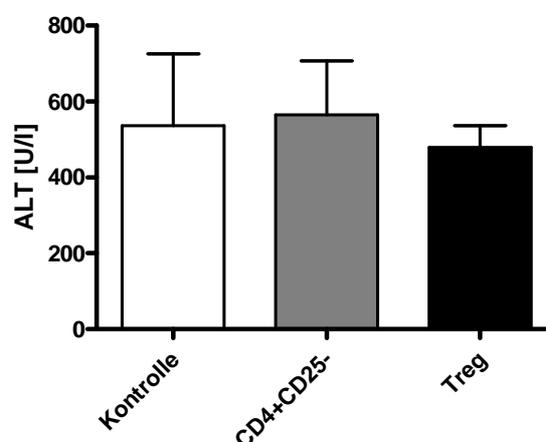


Abb.24) Serumtransaminasenwerte (ALT in U/l) in weiblichen MDR2^{-/-} Tieren nach Zelltransfer von CD4⁺CD25⁻ Zelltransfer (grau) und FVB Wildtyp Treg Transfer (schwarz) im Vergleich zur PBS behandelten Kontrollgruppe (weiß).

Es stellte sich die Frage, ob die transferierten FVB WT nTreg geeignet waren, einen Effekt auf die Entzündungsreaktion in der Leber der MDR2^{-/-} Tiere zu bewirken, da sie zum Zeitpunkt des Transfers nicht aktiviert waren. Weil es sich beim MDR2^{-/-} Modell um eine primär nicht Antigen bedingte portale Entzündung handelt, konnten wir die isolierten Treg nicht antigenspezifisch voraktivieren. Um trotzdem eventuell voraktivierte Treg zu transferieren, wurden nTreg aus erkrankten MDR2^{-/-} Tieren für den Transfer isoliert. Da das MDR2^{-/-} Modell deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede aufweist, könnten neben der Aktivierung der transferierten regulatorischen Zellen auch Unterschiede in der Effizienz der regulatorischen Zellen entscheidend für die fortschreitende Ausprägung der Erkrankung sein. Um mögliche geschlechtsspezifische Effekte adoptiv transferierter Treg zu berücksichtigen, wurde sowohl bei den Spendertieren als auch bei den Empfängertieren auf ein einheitliches Geschlecht geachtet. Die Analyse der Serumtransaminasen erfolgte im Tieralter von 8 Wochen.

Nach Transfer von Treg aus weiblichen MDR2^{-/-} Spendertieren in männliche MDR2^{-/-} Empfängertiere zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Serumtransaminasen zu den Tieren der Kontrollgruppen (Abb.25a). Durch den Transfer von MDR2^{-/-} Treg aus männlichen Spendertieren in weibliche MDR2^{-/-} Empfängertiere kam es ebenfalls zu keinem signifikanten Unterschied zu den Kontrollgruppen (Abb.25b). Auch der Transfer von MDR2^{-/-} Treg aus weiblichen Spendertieren in weibliche MDR2^{-/-} Empfängertiere führte zu keinem signifikanten Unterschied zu den Kontrollgruppen (Abb.25c). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch der Transfer von nTreg aus bereits erkrankten Spendertieren nicht ausreichte, um einen Einfluss auf die bestehende portale Entzündung der Empfängertiere zu haben. Auch konnten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Effizienz der transferierten regulatorischen T Zellen nachgewiesen werden.

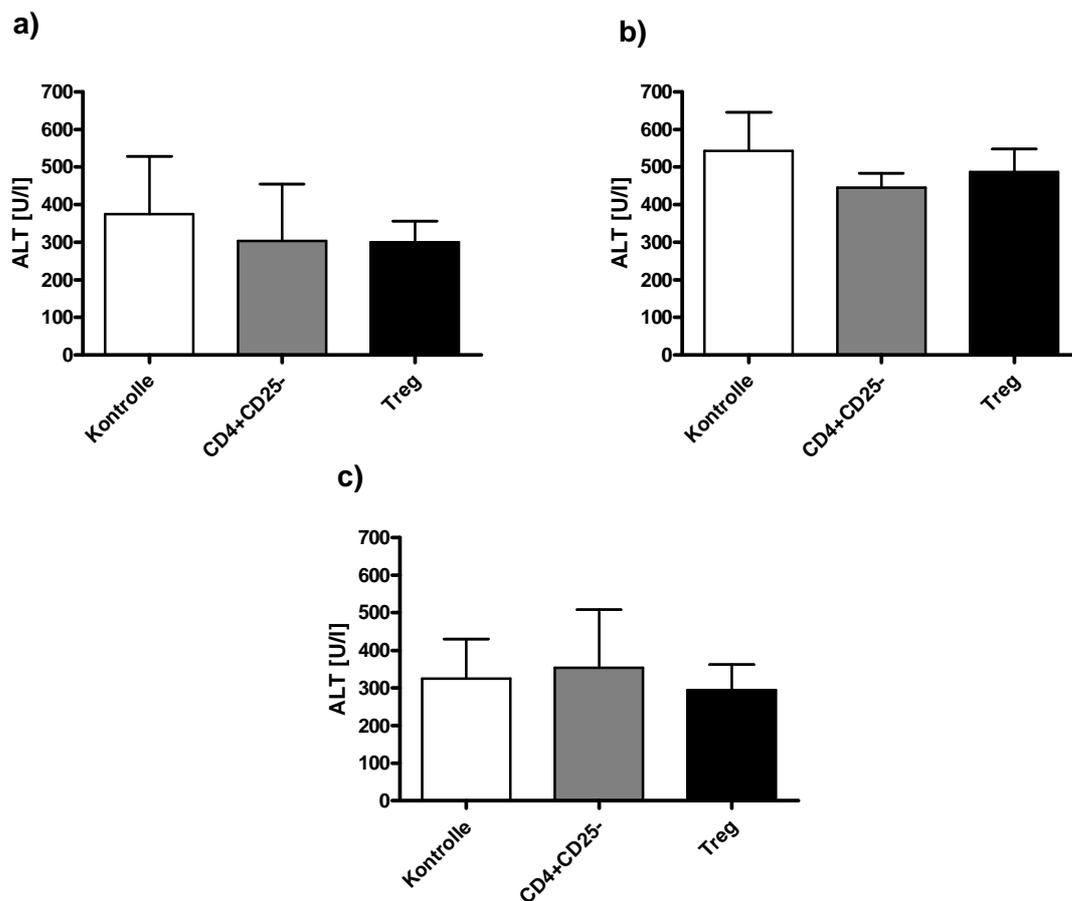


Abb.25) Serumtransaminasen (ALT in U/l) in MDR2-/- Tieren nach Zelltransfer von CD4+CD25- Zellen (grau) oder Treg (schwarz) im Vergleich zur PBS behandelten Kontrollgruppe (weiß). Dargestellt ist (a) der Transfer von nTreg aus weiblichen MDR2-/- Tieren in männliche MDR2-/- Empfängertiere. (b) Der Transfer von nTreg isoliert aus männlichen MDR2-/- Tieren in weibliche MDR2-/- Empfängertiere. (c) Der Transfer von nTreg aus weiblichen MDR2-/- Tieren in weibliche MDR2-/- Empfängertiere.

Da der Transfer isolierter FVB WT nTreg und der Transfer isolierter MDR2-/- nTreg keine Verbesserung der portalen Entzündung zur Folge hatte, stellten wir uns die Frage, ob eine Erhöhung der Anzahl und eine Steigerung der Funktionalität der transferierten Treg die Entzündungsreaktion positiv beeinflussen könnte. Hierfür sollte die Wirkung des Immunsuppressivums Rapamycin auf die sich spontan entwickelnde sklerosierende Cholangitis der MDR2-/- Tiere untersucht werden. Hierzu wurden den MDR2-/- Tieren ab einem Alter von 2 Wochen täglich Rapamycin (1,5mg/kg/KGW) i.p. appliziert. Aufgrund der geschlechtsspezifischen Unterschiede wurde bei den Versuchsgruppen auf ein einheitliches Geschlecht geachtet. Im Tialter von 8 Wochen erfolgte die Analyse der Serumtransaminasen der Rapamycin behandelten Tiere und ihrer Kontrollgruppe, welche tägliche i.p. Ethanol mit Wasser (Lösungsmittels von Rapamycin) erhalten hatte. Die Serumtransaminasen der Rapamycin behandelten MDR2-/- Tiere sank nach 4 wöchiger

Behandlung in den männlichen MDR2^{-/-} Tieren signifikant ab ($*p < 0,0424$) (Abb.26a). Auch bei den weiblichen Tieren führte die Rapamycingabe zu signifikant erniedrigten GPT Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe ($*p < 0,0262$) (Abb.26b). Somit zeigte sich, dass die alleinige Gabe des Immunsuppressivums Rapamycin sich positiv auf die Entzündungsreaktion der MDR2^{-/-} Tiere auswirkte.

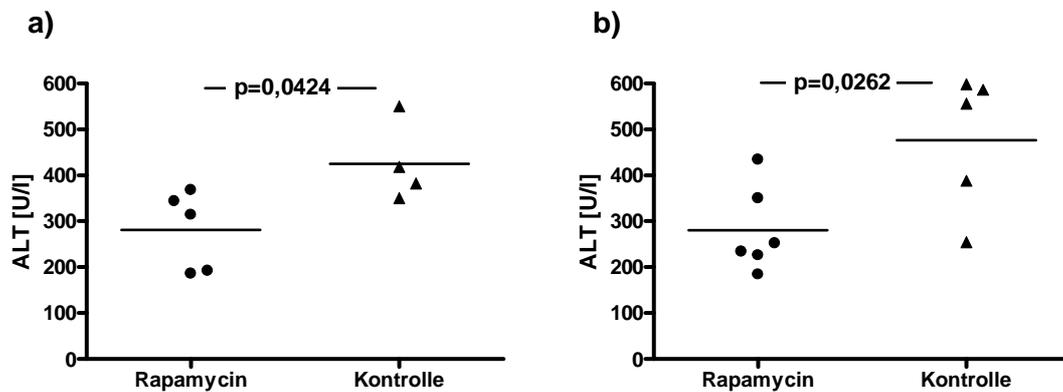


Abb.26) Serumtransaminasen (ALT in U/l) nach täglicher Rapamycingabe über einen Zeitraum von 4 Wochen in (a) männlichen MDR2^{-/-} Tieren (schwarze Punkte) und (b) weibliche MDR2^{-/-}-Tieren (schwarze Punkte) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren ohne Rapamycin (schwarze Dreiecke) ($*p < 0,0262$).

Wir wollten nun untersuchen, ob man den hemmenden Effekt auf die Entzündung der MDR2^{-/-} Tiere von Rapamycingabe durch zusätzlichen adoptiven Transfer von nTreg steigern könnte, da Rapamycin die Proliferation von Treg fördert. Deshalb wurden MDR2^{-/-} Tiere entsprechend des Zelltransferprotokolls (Abb.24) Treg transferiert und zusätzlich täglich mit Rapamycin (1,5mg/kg/KGW) oder dem Lösungsmittel von Rapamycin als Kontrolle i.p. behandelt. Die Rapamycingabe reduzierte die Serumtransaminasen signifikant im Vergleich zu der Kontrollgruppe ($***p = 0,0001$). Der Transfer der FVB- Wildtyp Treg unter Rapamycingabe führte ebenfalls zu einer signifikanten Verringerung der Serumtransaminasen im Vergleich zu der Kontrollgruppe ($*p = 0,0155$). Die Reduktion der Serumtransaminasen im Vergleich zur Kontrollgruppe war jedoch wesentlich geringer in der Rapamycin behandelten Gruppe mit Treg Transfer im Vergleich zur Rapamycin behandelten Gruppe ohne Transfer von Treg. Tatsächlich führte der Transfer der FVB Wildtyp Treg zu einer signifikanten Erhöhung der Serumtransaminasen im Vergleich zur alleinigen Rapamycingabe ($***p = 0,0001$) (Abb.27). Dieses Ergebnis zeigte, dass der nTreg Transfer unter Rapamycingabe keine zusätzliche Entzündungshemmung in der Leber der Empfängertiere bewirkte, sondern im Gegenteil die Leberschädigung verstärkte.

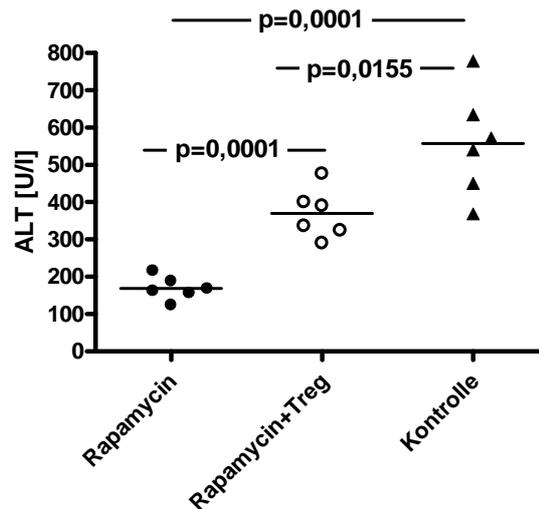


Abb.27) Serumtransaminasen (GPT in U/l) männlicher MDR2^{-/-} Tieren nach täglicher Rapamycingabe über einen Zeitraum von 4 Wochen ohne FVB WT Treg Transfer (schwarze Punkte) und mit FVB WT Treg Transfer (weiße Punkte) im Vergleich zu Kontrolltieren ohne Rapamycin und ohne Treg Transfer (schwarze Dreiecke) (**p<0,0001;*p<0,0155).

Um festzustellen, ob die signifikant veränderten Serumtransaminasen auch tatsächlich auf eine histologisch nachweisbare Pathologie der Leber zurückzuführen war, wurden H&E Färbungen zur histologischen Bestimmung des Entzündungsgrades angefertigt. Anschließend wurden die Schnitte verblindet von einem Pathologen nach einem allgemeinen modifizierten histologische Aktivitätsindex (mHAI Score) bewertet. Der mHAI Score beschreibt detailliert das Ausmaß der Grenzzonenhepatitis, der konfluierenden Nekrosen, von Einzelzelluntergängen und der portalen Entzündung [126]. In der Histologie zeigte sich, dass entsprechend der Transaminasenergebnisse die Entzündung der Rapamycin behandelten Tiere signifikant verringert war im Vergleich zu den Kontrolltieren, welche anstelle von Rapamycin Ethanol und Wasser (Lösungsmittel von Rapamycin) erhalten hatten (*p=0,049). Der zusätzliche Transfer von regulatorischen Zellen unter Rapamycingabe führte zu keiner Verringerung des Entzündungsgrades in der Leberhistologie der Tiere im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Der Treg Transfer führte vielmehr zu einem signifikant erhöhten Entzündungsgrad im Vergleich zu den MDR2^{-/-} Tieren, welche ausschließlich Rapamycin erhalten hatten (**p=0,0025) (Abb.28). Das Ergebnis der Histologieauswertung deckte sich somit mit den Ergebnissen der Serumtransaminasenbestimmung und weist weiter darauf hin, dass der Transfer der nTreg sich nicht hemmend auf die Leberentzündung in den Empfängertieren auswirkte.

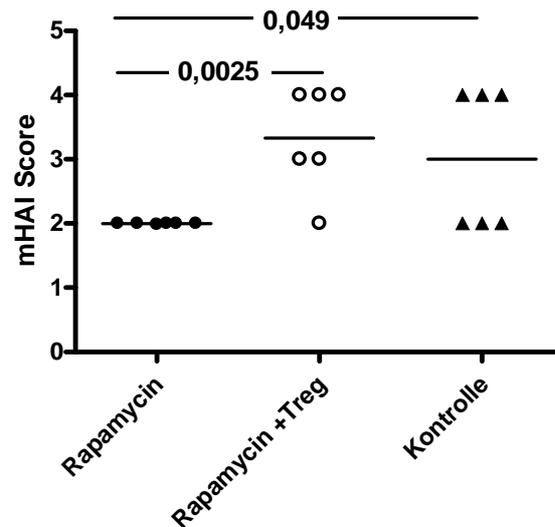


Abb.28) mHAI Score von H&E gefärbten Leberschnitten zum histologischen Nachweis der Leberschädigung in MDR2^{-/-} Tieren nach Rapamycingabe (schwarze Punkte), Rapamycingabe und nTreg Transfer (weiße Punkte) und Kontrolltieren ohne Rapamycin und Treg Transfer (schwarze Dreiecke) (**p<0,0025;*p<0,049).

Um den Einfluss der Rapamycingabe und des FVB Wildtyp Treg Transfers auf die Anzahl der regulatorischen Zellen zu untersuchen, wurde die Treg Anzahl in der Milz mittels durchflusszytometrischer Analyse der CD4+CD25+Foxp3+ T Zellen und in der Leber durch histologische CD3/Foxp3 Färbung bestimmt. In der Milz zeigte sich nach Rapamycingabe ein signifikanter Anstieg der Treg Anzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe (*p=0,0179). Auch die Rapamycin behandelte Gruppe mit Treg Transfer wies eine signifikant höhere Anzahl an Treg in der Milz im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (**p=0,0089) (Abb.29a). In der Leber war die Anzahl der Foxp3 positiven Zellen im Verhältnis zur Anzahl der CD3 positiven Zellen pro mm² in der Rapamycin behandelten Gruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht signifikant ändert. Auch die Rapamycingruppe mit Treg Transfer wies ebenfalls keine signifikant veränderte Anzahl an CD3+/Foxp3+ Zellen in der Leber im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe auf. Vergleicht man die Rapamycin behandelten Gruppen mit und ohne Treg Transfer, so zeigten sich auch hier keine signifikant veränderten Zellzahlen (Abb.29b).

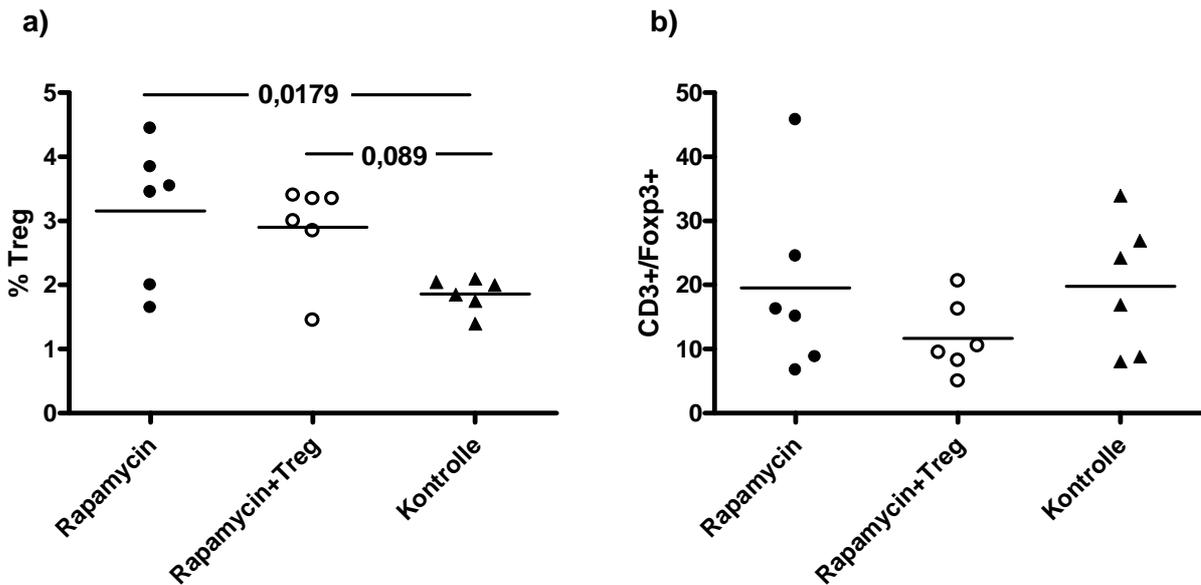


Abb.29) Anzahl regulatorischer Zellen in der Milz und der Leber in MDR2^{-/-} Männchen nach 4-wöchiger Rapamycingabe (schwarze Punkte), Rapamycingabe und nTreg Transfer (weiße Punkte) und Kontrolltieren ohne Rapamycin und Treg Transfer (schwarze Dreiecke) (a) Durchflusszytometrische Bestimmung der CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Milzzellen. (b) Histologische Auszählung der CD3 und Foxp3 positiven Zellen in der Leber.

Da der nTreg Transfer im MDR2^{-/-} Mausmodell zu keiner deutlichen Verringerung der Leberpathologie geführt hatte, sollte der Einfluss regulatorischer T Zellen auf ein weiteres nicht primär autoimmun induziertes Modell einer Leberschädigung untersucht werden. Hierfür verwendeten wir ein toxisch induzierbares Modell einer Gallengangsschädigung und biliärer Fibrose, bei dem C57Bl/6 WT Tiere für eine Woche 1%iges 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydroxycholesterin (DDC) Futter erhielten. Zusätzlich wurden einigen Tieren zu Beginn der DDC Fütterung regulatorische T Zellen transferiert. Bei dem durch DDC Fütterung induzierten Modell der Leberentzündung stellte sich erneut das Problem, dass man die transferierten nTreg nicht antigenspezifisch vorstimulieren konnte. Um jedoch wieder eine eventuelle Voraktivierung der nTreg zu erreichen, wurden die zu transferierenden nTreg aus WT Tieren isoliert, welche bereits für 1 Woche DDC Futter erhalten hatten. 1 Woche nach DDC Fütterung wurden die Serumtransaminasen der Tiere analysiert. Die Serumtransaminasen der Treg transferierten Gruppe wiesen zum Analysezeitpunkt keinen Unterschied im Vergleich zu der Kontrollgruppe, welche anstelle von Zellen PBS erhalten hatten, auf (Abb.30). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der alleinige Transfer von nTreg nicht ausreichte um einen Einfluss auf die bestehende portale Entzündung der Empfängertiere zu nehmen.

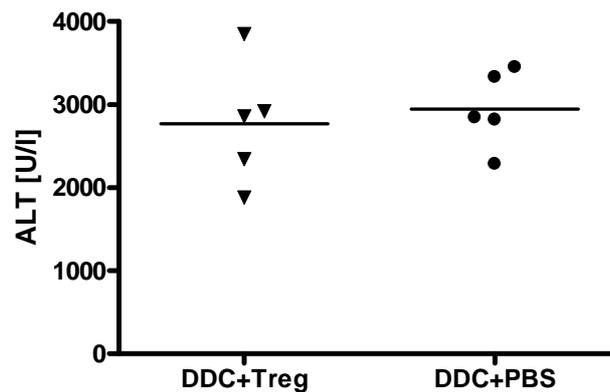


Abb.30) Serumtransaminasen (ALT in U/l) in C57Bl/6 WT Tieren nach Fütterung mit 0,1% DDC-Futter über einen Zeitraum von 1 Woche mit nTreg Transfer (schwarze Dreiecke) im Vergleich zur PBS behandelten Kontrolle (schwarze Punkte).

Die tägliche Gabe von Rapamycin hatte einen großen Einfluss auf die sich spontan entwickelnde sklerosierende Cholangitis im Modell der MDR2^{-/-} Tiere. Um den Einfluss von Rapamycin auf die Entzündungsreaktion eines toxisch induzierbaren Modells zu untersuchen, wurde die DDC Fütterung zusammen mit Rapamycingabe und Treg Transfer durchgeführt.

C57Bl/6 WT Tieren wurden zu Beginn der DDC Fütterung regulatorische T Zellen transferiert. Die transferierten Treg wurden aus C57Bl/6 WT Tieren isoliert, welche für 1 Woche DDC Futter erhalten hatten. Zusätzlich zum Zelltransfer und der DDC Fütterung erhielten die Tiere täglich Rapamycin (1,5mg/kg/KGW) i.p. bzw. das Lösungsmittel von Rapamycin als Kontrolle. Die Rapamycingabe reduzierte die Serumtransaminasen signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Rapamycin und ohne Treg Transfer (*p=0,0428). Der zusätzliche Transfer der C57/BL/6 Wildtyp Treg führte ebenfalls zu einer signifikanten Verringerung der Serumtransaminasen im Vergleich zu der Kontrollgruppe (*p=0,0254). Zwischen der Rapamycin behandelten Gruppe mit Treg Transfer und der Rapamycin behandelten Gruppe ohne Transfer von Treg konnte jedoch kein Unterschied in der Höhe der Serumtransaminasen festgestellt werden (Abb.31). Das Ergebnis zeigte, dass erneut die Gabe des Immunsuppressivums Rapamycin sich hemmend auf die Entzündungsreaktion der toxisch induzierten Leberentzündung auswirkte. Der zusätzliche Transfer der nTreg konnte den Rapamycin bedingten Effekt jedoch nicht weiter verstärken.

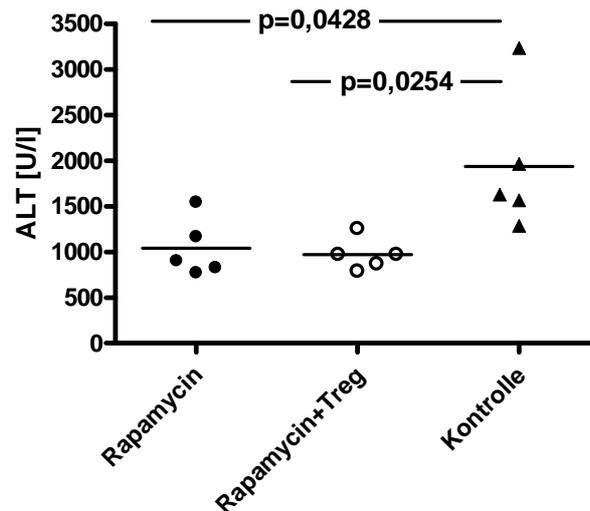


Abb.31) Serumtransaminasen (ALT in U/l) in C57Bl/6 WT Tieren nach Fütterung mit 0,1% DDC-Futter über einen Zeitraum von 1 Woche mit Rapamycingabe ohne nTreg Transfer (schwarze Punkte), mit nTreg Transfer und Rapamycingabe (weiße Punkte), im Vergleich zu Kontrolltieren ohne Rapamycin und ohne Treg Transfer (schwarze Dreiecke) (* $p < 0,0428$).

3.3.1 Treg Transferversuche in einem Mausmodell einer Antigen-abhängigen portalen Leberentzündung

Neben den primär nicht Antigen-abhängig induzierten Modellen entzündlicher Lebererkrankungen, sollte der Einfluss adoptiv transferierter Treg auf die Entzündungsreaktion der Leber in einem antigenspezifisch induzierbaren Modell untersucht werden. Hierfür wurden Treg Transferversuche im etablierten K14OVAp Modell durchgeführt. Da sich in diesem Modell die portale Entzündung der Leber nur in den weiblichen K14OVAp Tieren induzieren ließ, wurden für die Treg Transferversuche durchgängig nur Weibchen verwendet. Es erfolgte zusätzlich zum Transfer von transgenen OT1 CD8+ T Zellen in K14OVAp Weibchen, ein gleichzeitiger Transfer von frisch isolierten C57Bl/6 WT nTreg Zellen. An Tag 8 nach Zelltransfer wurden die Tiere analysiert. Die Serumtransaminasen der K14OVAp Weibchen nach OT1 CD8+ T Zelltransfer waren signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche anstelle des OT1 T Zelltransfers PBS erhalten hatten (** $p = 0,0015$). Auch die Tiere mit gleichzeitigem Transfer von OT1 CD8+ T Zellen und Treg wiesen signifikant erhöhte GPT Werte im Vergleich zur PBS Kontrollgruppe auf (** $p = 0,0012$). Der zusätzliche Treg Transfer bewirkte jedoch keine signifikante Änderung der Serumtransaminasen bei K14OVAp Weibchen nach OT1 Transfer, wenn auch ein leichter Trend zu höheren GPT Werten vorlag (Abb.32). Dies deutet auch in diesem Modell darauf hin, dass der Transfer von nTreg keinen Einfluss auf die Entzündungsreaktion der Leber hatte

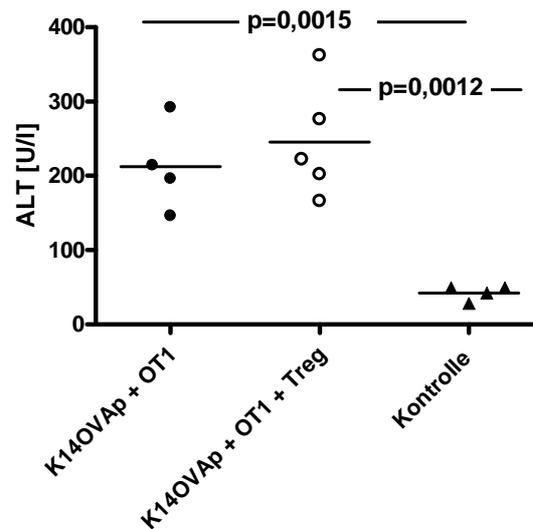


Abb.32) Serumtransaminasen (ALT in U/l) weiblicher K14OVAp Tiere nach Transfer von OT1 CD8+ T Zellen ohne nTreg Transfer (schwarze Punkte) oder nach Kotransfer von OT1 CD8+ T Zellen und nTreg (weiße Punkte), im Vergleich zur PBS behandelten Kontrollgruppe ohne Zelltransfer (schwarze Dreiecke) ($p < 0,0015$).**

Da der Transfer der C57Bl/6 nTreg keinen deutlichen Einfluss auf die portale Leberentzündung der K14 OVAp Weibchen hatte, sollte der Einfluss potenterer Treg auf die portale Entzündungsreaktion untersucht werden. Hierfür wurden nTreg aus hCD2-TGF β 1 Tieren isoliert. Diese Tiere überexprimieren aktives TGF β 1 T Zell spezifisch. In einem Asthmodell konnte zuvor gezeigt werden, dass der Transfer von nTreg, welche aus hCD2-TGF β 1 Tieren isoliert wurden, die Empfängertiere vor einer Atemwegshyperreagibilität (AHR) schützen können [129]. Um den Effekt dieser nTreg in unserem Modell zu untersuchen, wurde ein Kotransfer von frisch isolierten hCD2-TGF β 1 nTreg zusammen mit OT1 CD8+ Zellen durchgeführt. An Tag 8 nach Zelltransfer wurden die Tiere analysiert. Die Serumtransaminasen der K14OVAp Weibchen nach OT1 Transfer ohne Treg Transfer waren im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche anstelle der OT1 CD8+ T Zellen PBS erhalten hatte, signifikant erhöht (** $p = 0,0005$). Der Kotransfer der OT1 CD8+ Zellen zusammen mit hCD2-TGF β 1 nTreg führte ebenfalls zu einer signifikant Erhöhung der Serumtransaminasen der Empfängertiere im Vergleich zur PBS Kontrollgruppe (** $p = 0,0007$).

Der zusätzliche Transfer von hCD2-TGF β 1 nTreg bewirkte keine signifikante Änderung der Serumtransaminasen nach OT1 Transfer, wenn auch eine leichte Erhöhung der GPT Werte auffiel (Abb.33). Dieses Ergebnis weist erneut darauf hin, dass auch in dem Modell einer Antigen-abhängig induzierten portalen Entzündung der Transfer von regulatorischen

T Zellen keinen Einfluss auf die Wiederherstellung der immunologischen Toleranz der Leber hat.

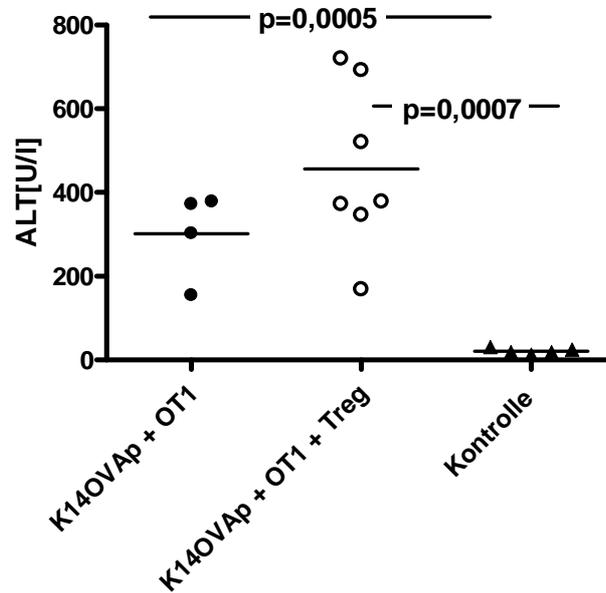


Abb.33) Serumtransaminasen (ALT in U/l) weiblicher K14Ovap Tiere nach Transfer von OT1 CD8+ T Zellen ohne nTreg Transfer (schwarze Punkte) oder nach Kotransfer von OT1 CD8+ T Zellen und hCD2-TGF β 1 Treg (weiße Punkte), im Vergleich zur PBS behandelten Kontrollgruppe ohne Zelltransfer (schwarze Dreiecke) (***) $p < 0,0007$).

3.4 Konversion von CD4+CD25-Foxp3- T Zellen

Der Transfer von regulatorischen T Zellen (Treg) in den hier untersuchten Mausmodellen der Leberentzündung war zur Wiederherstellung der immunologischen Toleranz nicht geeignet. Dies könnte in einer zu gering gewählten Anzahl oder einer unzureichenden Funktionalität der transferierten Treg liegen. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob sich durch *in vitro* Konversion von CD4+CD25- T Zellen zu stabilen iTreg geeignete Treg generieren ließen, welche eine Leberentzündung beeinflussen könnten.

Hierzu wurden CD4+CD25-Foxp3- T Zellen wurden per MACS aufgereinigt und eine suboptimale T Zellrezeptorstimulation über 4 Tage mit oder ohne Zugabe von TGF β durchgeführt. Ohne Zugabe von TGF β kam es unter suboptimaler T Zellrezeptorstimulation zu keiner Konversion von CD4+CD25-Foxp3- T Zellen hin zu CD4+CD25+Foxp3+ T Zellen. Nach Zugabe von TGF β zeigte sich eine messbare Konversion der naiven CD4 T Zellen hin zu CD4+CD25+Foxp3+ T Zellen (Abb. 34).

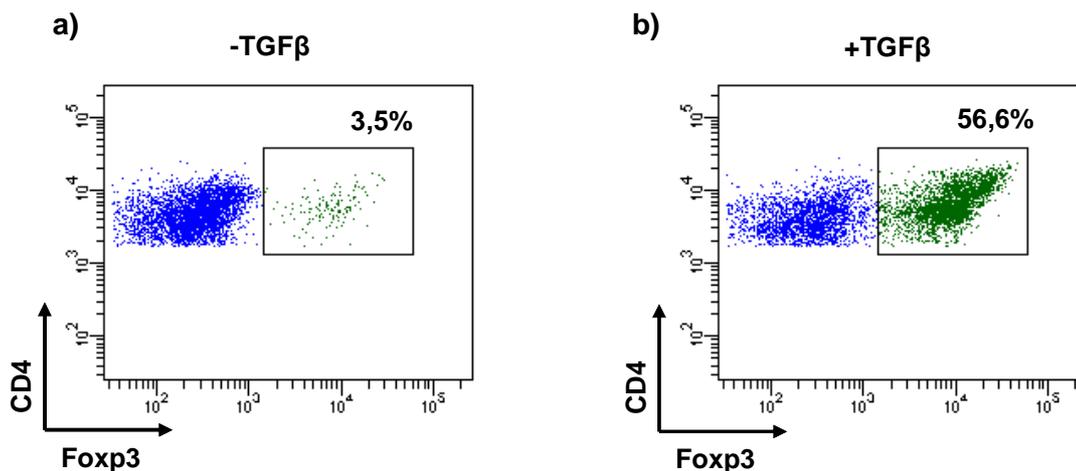


Abb.34) Durchflusszytometrische Bestimmung der Konversion von naiven CD4+ T Zellen (a) ohne und (b) mit Zugabe von TGF β . Dargestellt ist auf der y-Achse die CD4 Expression und auf der x-Achse die Foxp3 Expression der Zellen.

Dabei war die Konversionsrate der CD4+ T Zellen abhängig von der TGF β Konzentration. So führte die Zugabe von exogenem TGF β in steigender Dosierung (2-8 ng/ml) zu einer signifikant ansteigenden Erhöhung der Konversionsraten im Vergleich zur Kontrolle ohne TGF β (**p<0,0001) (Abb.35).

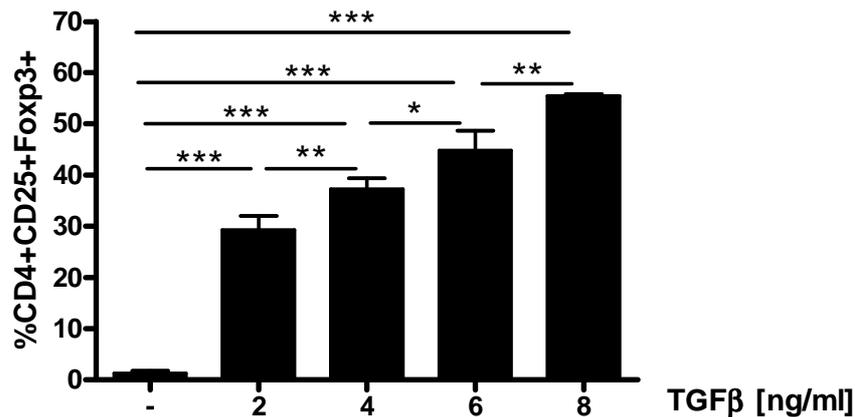


Abb.35) TGFβ-abhängige Konversion über 4 Tage von Foxp3- CD4+ T Zellen aus C57Bl/6 WT Tieren zu CD4+CD25+Foxp3+ iTreg Zellen unter suboptimaler T Zellrezeptorstimulation (**p<0,001; **p<0,0036; *p<0,0148).

Dass bereits geringe Mengen an TGFβ ausreichen, um eine effiziente Steigerung der Konversionsrate zu iTreg zu erreichen, bestätigte sich in Konversionsversuchen mit Foxp3- CD4+ T Zellen aus hCD2TGFβQ transgenen Mäusen welche bereits ohne Zugabe von exogenem TGFβ eine signifikant erhöhte Konversionsrate im Vergleich zu WT T Zellen aufwiesen (**p=0,0019). Unter Zugabe von exogenem TGFβ in ansteigender Konzentration (2-6ng/ml) wiesen die hCD2TGFβQ T Zellen jeweils signifikant erhöhte Konversionsraten im Vergleich zu CD4+ T Zellen aus WT Tieren auf (**p<0,013) (Abb.36).

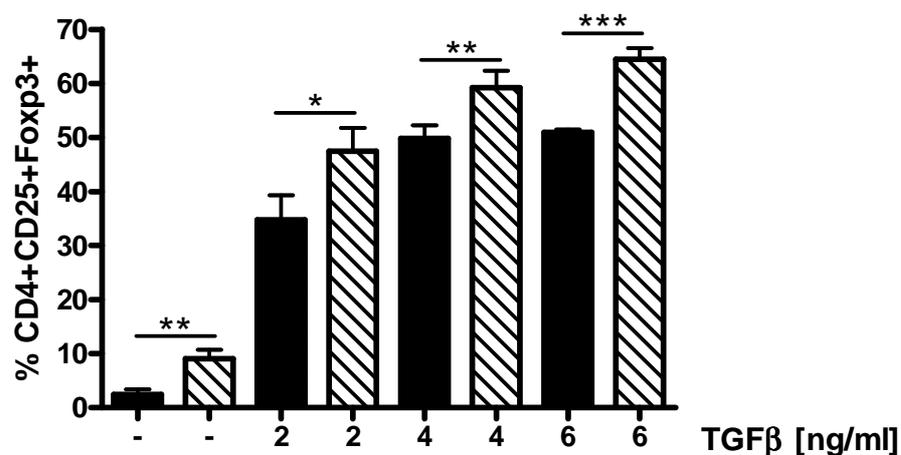


Abb.36) Konversionsrate Foxp3- CD4+ T Zellen aus C57Bl/6 WT Tieren (schwarze Balken) und hCD2TGFβ transgenen Tieren (schwarz schraffierte Balken) mit und ohne Zugabe von exogenem TGFβ (**p<0,0001; **p<0,0082; *p<0,0130).

3.4.1 Steigerung der Konversionsrate

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass TGF β essentiell für die Konversion naiver CD4+ T Zellen hin zu iTreg ist. Es stellte sich nun die Frage, ob es weitere Substanzen gibt, welche in der Lage sind, die Konversionsrate weiter zu steigern. Als eine solche Substanz wurde bereits Retinsäure beschrieben, welche merklich die TGF β induzierte Foxp3 Expression bei Mäusen steigern konnte [130]. Um den Konversionssteigernden Effekt von RA zu überprüfen wurden Foxp3- CD4+ T Zellen mit und ohne Zugabe von TGF β in steigender Konzentration, sowie mit und ohne Zugabe von RA kultiviert. TGF β -unabhängig konnte Retinsäure alleine keine Konversion der naiven CD4+ T Zellen induzieren. All-trans Retinsäure in Verbindung mit TGF β jedoch erhöhte die Konversionsrate signifikant im Vergleich zur alleinigen TGF β Zugabe (**p=0,0004) (Abb.37). Somit konnte gezeigt werden, dass Retinsäure die Rate der TGF β -abhängigen Konversion von Foxp3- CD4+ T Zellen TGF β erhöhen kann.

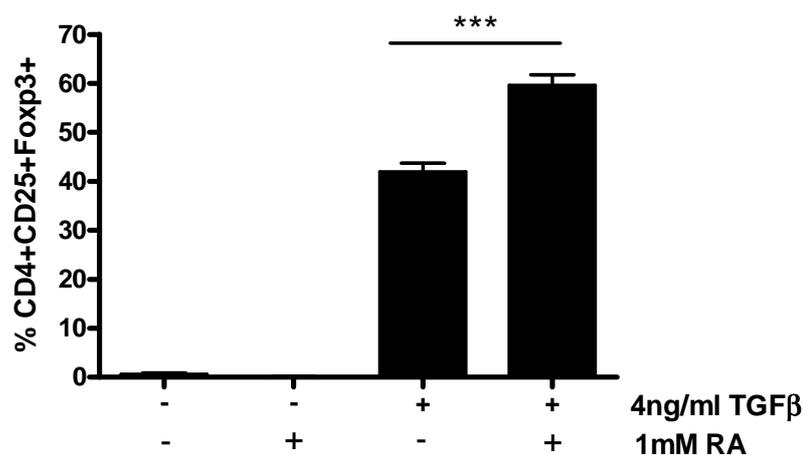


Abb.37) Konversionsrate Foxp3- CD4+ T Zellen aus C57Bl/6 WT Tieren mit und ohne Zugabe von TGF β und Retinsäure (RA) (p=0,0004).**

Neben Retinsäure gilt Rapamycin als ein bedeutender Modulator für den Erhalt und die Proliferation und von regulatorischen T Zellen. So fördert die Anwesenheit von Rapamycin und IL-2 das Überleben und die Proliferation von nTreg *in vitro* [131-133]. Neben den positiven Effekten auf nTreg konnte auch die Konversionsrate von naiven human CD4+ T Zellen unter Zugabe von Rapamycin erhöht werden [134]. Um dies zu überprüfen wurden Foxp3- CD4+ T Zellen mit und ohne Zugabe von TGF β in steigender Konzentration, sowie mit und ohne Rapamycin kultiviert. TGF β -unabhängig konnte Rapamycin alleine keine

Konversion der Foxp3- CD4+ T Zellen induzieren. Rapamycin in Verbindung mit TGF β (2ng/ml) erhöhte die Konversionsrate signifikant im Vergleich zur alleinigen Zugabe von TGF β (2ng/ml) ($p=0,018$). Bei hohen Dosen an exogenem TGF β (4ng/ml) und einer optimalen Konversion unter TGF β konnte keine weitere Steigerung der Konversionsrate durch Zugabe von Rapamycin erreicht werden (Abb.38). Somit konnte gezeigt werden, dass Rapamycin die TGF β abhängig Konversion von Foxp3- CD4+ T Zellen steigern konnte.

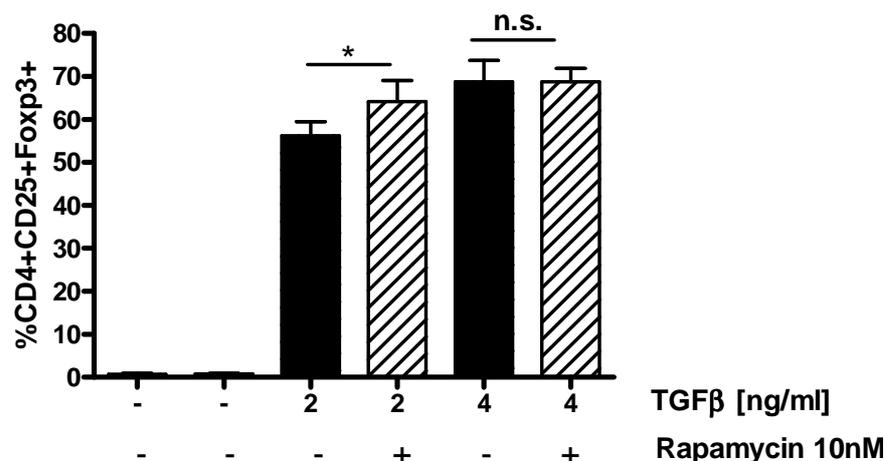


Abb.38) Konversionsrate Foxp3- CD4+ T Zellen aus C57Bl/6 WT Tieren mit und ohne Zugabe von TGF β und Rapamycin

Dass gerade bei geringen Mengen an TGF β eine Steigerung der Konversionsrate durch Rapamycin zu verzeichnen ist, zeigten Konversionsversuche mit Foxp3- CD4+ T Zellen aus hCD2TGF β transgenen Mäusen. Bereits ohne die Zugabe von exogenem TGF β erhöhte sich die Konversionsrate der hCD2TGF β CD4+ T Zellen signifikant unter Zugabe von Rapamycin ($***p=0,0002$). Auch bei Zugabe geringer Mengen an exogenem TGF β (2ng/ml) zeigte sich eine signifikant höhere Konversionsrate der Zellen, welche zusätzlich mit Rapamycin stimuliert wurden ($**p=0,002$). Bei hohen Dosen an exogenem TGF β (4ng/ml) und einer optimalen Konversion unter TGF β konnte keine weitere Steigerung der Konversionsrate durch Rapamycin verzeichnet werden (Abb.39). Die Ergebnisse bestätigen, dass Rapamycin die TGF β abhängig Konversionsrate Foxp3- CD4+ T Zellen, insbesondere bei geringen Mengen an TGF β , erhöhen konnte.

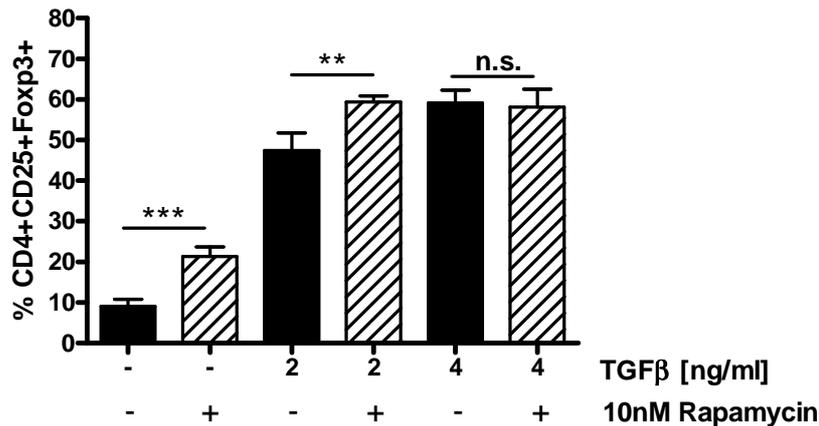


Abb.39) Konversionsrate Foxp3- CD4+ T Zellen aus hCD2TGFβ Tieren mit und ohne Zugabe von TGFβ (schwarze Balken) und Rapamycin (schwarz schraffierte Balken) (**p<0,0002; **p<0,002).

Als wichtiger Mechanismus in der Generierung stabiler iTreg gilt die Demethylierung der DNA im Foxp3 Gen. So ist eine effiziente DNA Demethylierung für die stabile Foxp3 Expression *in vitro* konvertierter Treg von entscheidender Bedeutung [89]. Um zu überprüfen, ob sich die Konversion von Treg durch Beeinflussung der DNA-Methylierung beeinflussen lässt, wurden Konversionsversuche mit Azathymidin durchgeführt. Bei suboptimalen T Zellrezeptorstimulation konnte Azathymidin unabhängig von TGFβ keine Konversion der Foxp3- CD4+ T Zellen induzieren. Auch in Verbindung mit TGFβ in verschiedenen Konzentrationen (2ng/ml und 4ng/ml) führte die Zugabe von Azathymidin nicht zu einer gesteigerten Konversionsrate (Abb.40). Somit konnte durch die Zugabe von Azathymidin keine Verbesserung der Konversionsrate, wie bei Zugabe von Rapamycin oder Retinsäure erreicht werden.

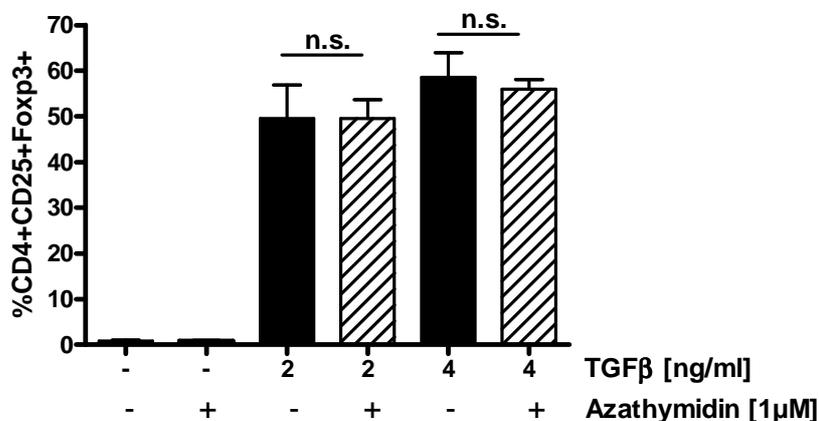


Abb.40) Konversionsrate Foxp3- CD4+ T Zellen aus C57Bl/6 WT Tieren mit und ohne Zugabe von TGFβ und Azathymidin (schraffierte Balken)

Da die Kombination aus niedrig dosiertem TGF β und Rapamycin zu einer signifikanten Steigerung der Konversionsrate (Abb.36/37) führte, Azathymidin in Verbindung mit TGF β jedoch die Konversionsrate nicht verbessern konnte (Abb.39), stellte sich die Frage, ob die Kombination von Rapamycin und Azathymidin eine Steigerung TGF β abhängigen Konversionsrate bewirken könnte. Aus diesem Grund wurden Foxp3- CD4+ T Zellen mit der Kombination von TGF β , Rapamycin und Azathymidin über 4 Tage kultiviert. Die alleinige Zugabe von Rapamycin (10mM) steigerte die TGF β - induzierte Konversionsrate signifikant im Vergleich zur Konversion unter alleiniger TGF β Gabe (*p=0,0180). Azathymidin alleine führte zu keiner Steigerung der TGF β - induzierten Konversionsrate und auch die Kombination aus Rapamycin (10mM) und Azathymidin(1 μ M) konnte die TGF β - induzierte Konversionsrate nicht weiter steigern. Im Gegenteil führte die Kombination aus Rapamycin und Azathymidin sogar zu einer niedrigeren Konversionsrate im Vergleich zur TGF β - induzierten Konversion (*p=0,0344) und der mit TGF β und Rapamycin induzierten Konversion (**p=0,0014) (Abb.41).

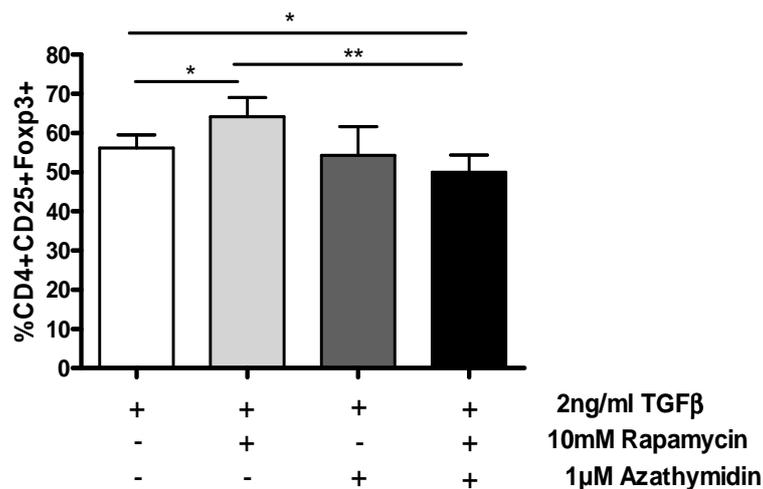


Abb.41) Konversionsrate Foxp3- CD4+ T Zellen aus C57Bl/6 WT Tieren unter Zugabe von TGF β (weiße Balken), TGF β und Rapamycin (hellgrauer Balken), TGF β und Azathymidin (dunkelgrauer Balken) und der Kombination aus TGF β , Rapamycin und Azathymidin (schwarzer Balken) (p<0,0014;*p<0,01).**

Da Azathymidin in Kombination mit Rapamycin und TGF β keine Steigerung der Konversionsrate induzieren konnte, wurde als weitere mögliche Kombination Retinsäure und Rapamycin getestet; beide Substanzen waren alleine in der Lage die Konversionsrate unter Zugabe von TGF β zu steigern (Abb.35/36/37). Hierzu wurden Foxp3- CD4+ T Zellen mit der Kombination von TGF β , Rapamycin und Retinsäure über 4 Tage kultiviert. Wie

zuvor steigerte die Kombination von TGF β mit Rapamycin (10mM) die Konversionsrate signifikant im Vergleich zur Konversionsrate nach alleiniger TGF β Zugabe (*p=0,0381). Auch die Kombination von Retinsäure mit TGF β führte zu einer signifikanten Steigerung der Konversionsrate (**p=0,0002). Die Kombination aus TGF β (2ng/ml), Rapamycin (10mM) und Retinsäure (1mM) führte zwar ebenfalls zu einer signifikanten Steigerung der Konversionsrate (**p=0,0016) im Vergleich zur durch alleinige Zugabe von TGF β induzierten Konversion; die Konversionsrate war jedoch tendenziell niedriger als die Konversionsrate induzierte durch die Kombination aus Retinsäure und TGF β (Abb.42). Somit konnte mit der Kombination aus Rapamycin und Retinsäure die TGF β abhängige Konversionsrate nicht weiter verbessert werden.

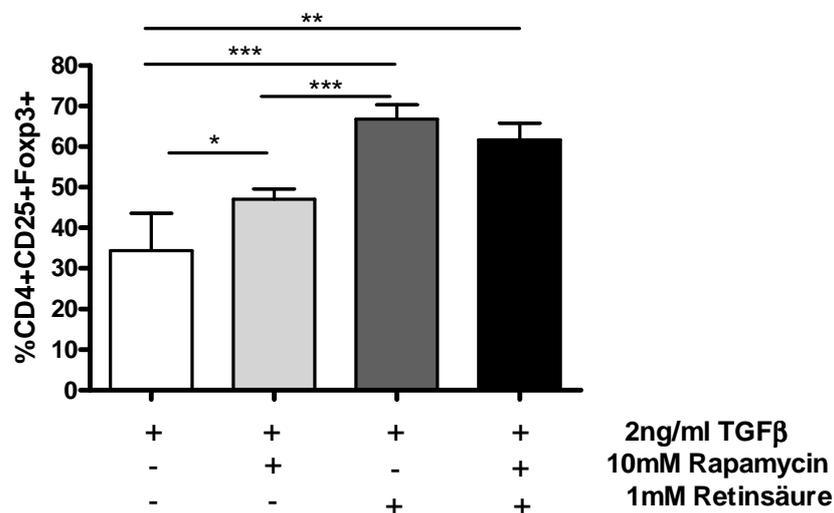


Abb.42) Konversionsrate Foxp3- CD4+ T Zellen aus C57Bl/6 WT Tieren unter Zugabe von TGF β (weiße Balken), TGF β und Rapamycin (hellgrauer Balken), TGF β und Retinsäure (dunkelgrauer Balken) und der Kombination aus TGF β , Rapamycin und Retinsäure (schwarzer Balken) (**p<0,0002, **p<0,0016, *p<0,0381).

3.4.2 Stabilität der Foxp3 Expression nach Konversion

Ein großes Problem von *in vitro* konvertierten iTreg ist die mangelnde Stabilität ihres Phänotyps. Der Erhalt der Foxp3 Expression nach Konversion ist jedoch Voraussetzung für die regulatorische Funktionalität der Zellen und somit auch für die effektive Nutzung der generierten regulatorischen Zellen *in vivo*. Um festzustellen, ob die hier beschriebenen generierten iTreg einen stabilen Phänotyp besitzen, wurden CD4+CD25-Foxp3- T Zellen über 4 Tage unter suboptimaler T Zellrezeptorstimulation in Anwesenheit von TGF β (4ng/ml) kultiviert. An Tag 4 der Konversion wurden die Zellen geerntet. Ein Teil der Zellen wurde auf ihre Foxp3 Expression hin analysiert. Der Rest der Zellen wurde mit aCD3 und aCD28 unter Zugabe verschiedener Stimulantien restimuliert. Nach weiteren 4 Tagen erfolgte erneut eine Analyse der Zellen und eine weitere Restimulation in den entsprechenden Stimulationsgruppen. Die endgültige Analyse der Foxp3 Expression der Zellen erfolgte dann nach weiteren 4 Tagen Stimulation. Es zeigte sich, dass nach der 1. Restimulation die Rate der Foxp3 Expression in den iTreg deutlich abnahm, welche allein mit TGF β (4ng/ml) restimuliert wurden. Die 1. Restimulation der iTreg mit TGF β (4ng/ml) und Rapamycin (10mM) führte hingegen zu einer stabilen Foxp3 Expressionsrate. Die Zugabe von Rapamycin (10mM) alleine konnte die Rate der Foxp3 Expression der iTreg etwa gleich derjenigen nach alleiniger TGF β Stimulation halten. Ohne Zugabe von TGF β und Rapamycin sank die Rate der Foxp3 Expression in den konvertierten iTreg Zellen deutlich ab. Nach der 2. Restimulation sank die Foxp3 Expression in allen 4 Stimulationsgruppen im Vergleich zur ursprünglichen Konversionsrate deutlich ab (Abb.41). Der Versuch zeigte, dass die alleinige Restimulation der iTreg Zellen mit TGF β die Foxp3 Expression der iTreg nicht so stabil erhalten konnten wie die Kombination aus TGF β und Rapamycin. Dies deutet darauf hin, dass Rapamycin einen positiven Einfluss auf die Stabilität der Foxp3 Expression nach Konversion haben könnte.

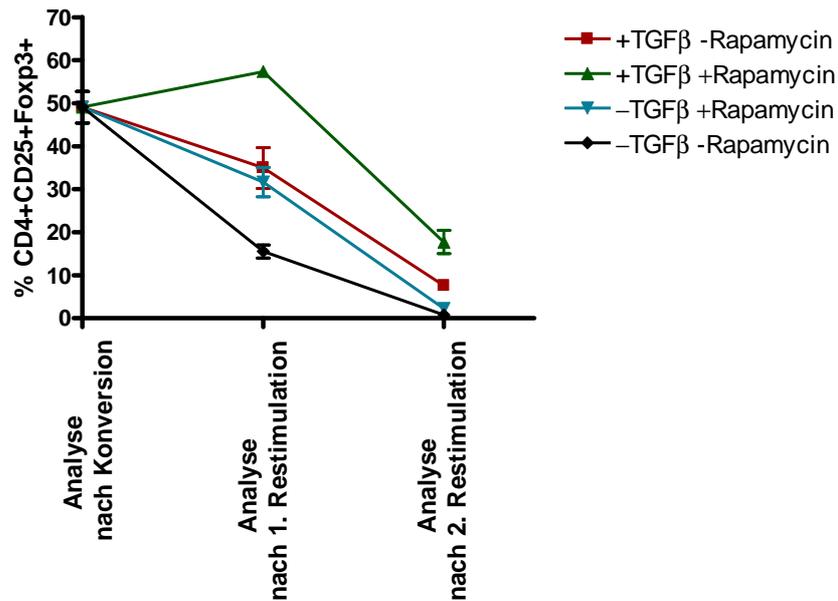


Abb.43) Restimulation TGFβ-induzierter iTreg. Nach 4 Tagen Konversion wurden die generierten iTreg mit aCD3 und aCD28 (schwarze Linie) restimuliert, sowie zusätzlich mit TGFβ (rote Linie), mit TGFβ und Rapamycin (grüne Linie), oder mit Rapamycin (blaue Linie) behandelt. Eine zweite Restimulation erfolgte 4 Tage später entsprechend der ersten Restimulation. Nach weiteren 4 Tagen wurden die zweifach restimulierten Zellen im Durchflusszytometer auf ihr Foxp3 Expression hin analysiert.

Um festzustellen, ob iTreg, welche durch die Kombination von Rapamycin und TGFβ generiert wurden, möglicherweise einen stabileren Phänotyp besitzen, wurden CD4+CD25-Foxp3- T Zellen über 4 Tage unter suboptimaler T Zellrezeptorstimulation in Anwesenheit von TGFβ (4ng/ml) und Rapamycin (10mM) kultiviert. An Tag 4 der Konversion wurden die Zellen geerntet. Ein Teil der Zellen wurde wieder auf ihre Foxp3 Expression hin analysiert. Der Rest der Zellen wurde mit aCD3 und aCD28 ohne weitere Stimulation oder unter Zugabe von TGFβ und Rapamycin, jeweils alleine oder in Kombination, restimuliert. Nach 4 Tagen erfolgte eine erneute Analyse der Zellen und eine weitere Restimulation entsprechend der Vorstimulation. Die endgültige Analyse der Zellen hinsichtlich ihrer Foxp3 Expression erfolgte nach weiteren 4 Tagen. Es zeigte sich, dass nach der 1. Restimulation mit TGFβ (4ng/ml) die Foxp3 Expression in den iTreg stabil erhalten blieb. Die 1. Restimulation der iTreg mit TGFβ (4ng/ml) und Rapamycin (10mM) führte ebenfalls zu einer stabilen Foxp3 Expression. Auch die Zugabe von Rapamycin (10mM) alleine konnte die Foxp3 Expression aufrechterhalten, wobei die Rate der Foxp3 Expression vergleichbar war mit der Rate der Foxp3 Expression nach Restimulation ohne TGFβ und Rapamycin. Nach der 2. Restimulation zeigten die iTreg, welche unter Zugabe von TGFβ und Rapamycin restimuliert wurden, die höchste Rate an

Foxp3 Expression. Im Vergleich hierzu führte die alleinige Zugabe von TGF β zwar zu einer reduzierten Rate an Foxp3 Expression, doch konnten mehr als die Hälfte der Zellen ihre Foxp3 Expression aufrechterhalten. Unter Zugabe von Rapamycin ohne TGF β kam es zu einem deutlichen Verlust der Foxp3 Expression, doch konnte noch etwa ein Drittel der Zellen ihre Foxp3 Expression aufrechterhalten. Ohne Zugabe von Rapamycin und TGF β zeigte sich ebenfalls ein Verlust der Foxp3 Expression, aber auch hier konnte ein Drittel der Zellen ihre Foxp3 Expression aufrechterhalten (Abb.43). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Konversion mit TGF β unter Zugabe von Rapamycin iTreg generiert, welche wesentlich stabiler ihre Foxp3 Expression aufrecht erhalten konnten, im Vergleich zu iTreg, welche alleine mit TGF β generiert wurde. Somit scheint Rapamycin eine wichtige Rolle bei der Induktion stabiler *in vitro* generierter iTreg zu spielen.

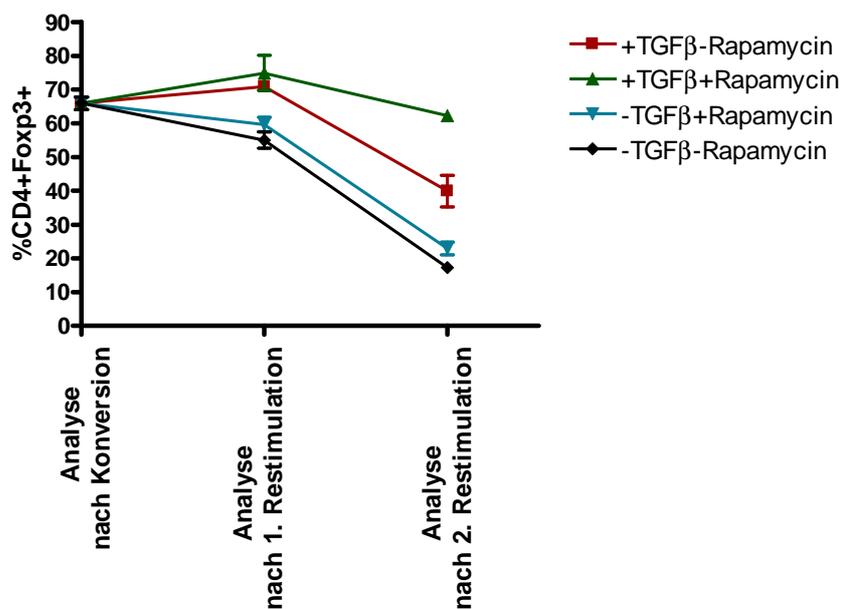


Abb.44) Restimulation von iTreg, die durch TGF β und Rapamycin generiert wurden. Nach 4 Tagen Konversion wurden die generierten iTreg mit aCD3 und aCD28 (schwarze Linie) restimuliert, sowie zusätzlich mit TGF β (rote Linie), mit TGF β und Rapamycin (grüne Linie), oder mit Rapamycin (blaue Linie) behandelt. Eine zweite Restimulation erfolgte 4 Tage später entsprechend der ersten Restimulation. Nach weiteren 4 Tagen wurden die zweifach restimulierten Zellen auf ihre Foxp3 Expression hin im Durchflusszytometer analysiert.

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung und Charakterisierung von Mausmodellen Antigen-spezifischer und Antigen-unabhängiger portaler Entzündung. Im Anschluss an die Etablierung der Tiermodelle sollte der Einfluss des adoptiven Transfers von regulatorischen T Zellen auf die Leberentzündung untersucht werden. Zudem sollte eine Weiterentwicklung der *in vitro* Konversion von CD4+CD25-Foxp3- T Zellen zu stabilen iTreg durchgeführt werden.

4.1 Etablierung einer portalen Antigen-abhängigen Entzündung im K14OVAp Mausmodell

Die Etablierung und Charakterisierung neuer Mausmodelle der portalen Leberentzündung ist von großem Interesse für das Verständnis der Pathogenese von autoimmunen Lebererkrankungen. Als eine der drei beschriebenen autoimmunen Lebererkrankungen gilt die Primär Biliäre Zirrhose (PBC). Die PBC ist eine chronisch verlaufende Erkrankung, die sich primär durch die Zerstörung der kleinen intrahepatischen Gallengänge auszeichnet, was im Verlauf zu einer progressiven Zerstörung der Gallengänge und letztlich zur Leberzirrhose führt [11, 12]. Besonderes Merkmal der PBC ist, dass Frauen etwa 10mal häufiger erkranken als Männer [12]. Für die PBC konnten bereits einige Mausmodelle beschrieben werden, wie z.B. das Modell der NOD.c3c4 Maus [27], das Modell der dominant negativen TGF β Rezeptor II (dnTGF β RII) Maus [29], das Modell der IL-2R α -/- Maus [30] und das Modell der Ae2_{a,b}-/- Maus [31, 31]. Alle Modelle weisen immunologische, biochemische und hepatobiliär-morphologische Eigenschaften der PBC auf. Der Nachteil dieser Modelle liegt jedoch darin, dass sie sich spontan entwickeln und somit nicht in adulten Tieren induzierbar sind. Zudem weisen sie keine geschlechtsspezifischen Unterschiede im Verlauf der Immunpathologie auf, was deutlich der überwiegend weiblichen Erkrankungsrate beim Menschen widerspricht [32]. In dieser Arbeit wurde als Modell einer Antigen-spezifischen portalen Entzündung das transgene K14OVAp Mausmodell untersucht. Durch Transfer von OT1 CD8+ T Zellen, welche den spezifischen Rezeptor für das auf den Gallengangsepithelzellen exprimierte SIINFEKL Peptid besitzen, sollte eine portale Entzündung induziert werden.

Die Ergebnisse zeigten, dass die weiblichen K14OVAp Tiere suzeptibler auf den Transfer der OT1 CD8+ T Zellen reagierten. So wiesen die weiblichen K14OVAp Empfängertiere im Vergleich zu den männlichen K14OVAp Empfängertieren eine erhöhte Sterblichkeitsrate auf (Abb.4). Ebenso waren die Serumtransaminasen im zeitlichen Verlauf, wie auch an Tag 9 nach OT1 CD8+ T Zelltransfer in den weiblichen K14OVAp

Tieren erhöht (Abb.5 und 6) Dies spiegelte sich auch in einer histologisch nachweisbaren Entzündung der Leber wider, welche gekennzeichnet war durch peribiliäre und periportale Infiltrate, sowie Endothelitis (Abb.7). Zudem entwickelten 50% der weiblichen K14OVAp Tiere zu 50% positiv AMA Antikörper nach OT1 CD8+ T Zelltransfer (Tab.1). Bei den männlichen K14OVApTiere hingegen schien der OT1 CD8+ T Zelltransfer keinen Einfluss auf die Sterblichkeitsrate und die Serumtransaminasen und zu haben. Auch wiesen die männlichen K14OVAp Tieren nach Zelltransfer keine histologisch nachweisbare Entzündungen der Leber auf (Abb.5, 6 und 7) und keines der Tiere entwickelte AMA Antikörper (Tab.1).

Dass sich die Unterschiede dabei organspezifisch auf die Leber beziehen, konnte anhand der histologischen Auswertung von Organen nachgewiesen werden, welche ebenfalls das Ovalbuminpeptid als Transgen exprimieren [32, 127]. Hier zeigten sich keine Unterschiede im Entzündungsgrad zwischen den weiblichen und den männlichen Empfängertieren (Abb. nicht gezeigt)

Wir vermuteten zunächst, dass Unterschiede in der Rekrutierung der transferierten OT1 CD8+ T Zellen in die Lebern der männlichen und weiblichen K14OVAp Tiere für die geschlechtsspezifischen Unterschiede verantwortlich waren. Durch Verwendung kongener CD8+CD45.1+ OT1 T Zellen konnte jedoch nachgewiesen werden, dass in der Leber und der Milz der männlichen und weiblichen Empfängertiere gleich viele transferierte Zellen vorhanden waren (Abb.9). Dies deutet darauf hin, dass die geschlechtsabhängigen Unterschiede der portalen Entzündung nicht durch unterschiedliches Überleben der transferierten Zellen oder deren unterschiedliche Rekrutierung in die Leber der Empfängertiere erklärt werden konnte.

Des Weiteren vermuteten wir, dass Unterschiede in den regulatorischen Funktionen von Immunzellen verantwortlich für die geschlechtsspezifischen Unterschiede waren. Hierbei standen insbesondere die CD4+CD25+Foxp3+ regulatorischen T Zellen (Treg) im Fokus des Interesses, da Treg wichtige Mediatoren der Immuntoleranz darstellen und eine Beeinträchtigung ihrer Funktion autoimmune Erkrankungen verursachen können [91]. Obwohl die Rolle von Treg bei autoimmunen Lebererkrankungen noch nicht vollständig geklärt ist, weisen einige Studien darauf hin, dass sie einen entscheidenden Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung haben könnten. So wurde bereits bei PBC Patienten eine signifikant verringerte Anzahl an CD4+CD25^{high} Treg beschrieben [135] und weitere deskriptive Studien beschreiben eine verminderte Anzahl und Funktion von Treg bei anderen humanen autoimmunen Lebererkrankungen [113-115]. Auch in einem Mausmodell der Autoimmunen Hepatitis konnte eine verminderte Anzahl der regulatorischen T Zellen in den weiblichen Tieren im Vergleich zu den männlichen Tieren gezeigt werden. Interessant in diesem Modell war, dass hier ebenfalls eine deutlich

schlechtere Krankheitsprognose der weiblichen Tiere vorlag [128]. Um festzustellen, ob auch in unserem Modell eine verminderte Anzahl der Treg verantwortlich für die geschlechtsabhängigen Unterschiede in der Entzündungsreaktion waren, wurde eine Analyse der Treg Zellen in Milz und Leber durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass es keine signifikanten Unterschiede in der Treg Anzahl in der Leber von männlichen und weiblichen K14OVAp Empfängertieren nach Zelltransfer von OT1 CD8+ T Zellen gab (Abb.10). Auch in der Foxp3 Expression der CD4+ Leberlymphozyten zeigten sich keine Unterschiede zwischen den mit OT1 CD8+ T Zellen transferierten männlichen und weiblichen K14OVAp Tieren (Abb.10). Dieses Ergebnis steht somit im Gegensatz zu den Daten aus dem Mausmodell der Autoimmunen Hepatitis und spricht dafür, dass die Anzahl der regulatorischen T Zellen für die Ausprägung der Entzündung im Modell der K14OVAp Tiere keine Rolle spielt. Die Anzahl der regulatorischen Zellen alleine gibt jedoch noch keinen Hinweis auf ihre Funktionalität. So muss in weiteren Experimenten analysiert werden, ob eine gestörte Funktionalität für die Unterschiede in der Leberentzündung der männlichen und weiblichen K14OVAp Tiere verantwortlich sein könnte. Hierfür sollen Suppressionsassays der isolierten Treg Zellen durchgeführt werden. In diesem Assay wird die Proliferation von CFSE-gefärbten Effektorzellen in Abwesenheit oder unter Zugabe von Treg gemessen. Da bei jeder Zellteilung die Fluoreszenzintensität des CFSE Farbstoffs um die Hälfte abnimmt, kann mittels Durchflusszytometrie ermittelt werden, wie oft die Zellen sich geteilt haben und eine Aussage darüber getroffen werden, wie effizient die zugegebenen Treg die Proliferation der Effektorzellen supprimieren konnten.

Da sowohl die Analyse der Rekrutierung der transferierten OT1 CD8+ T Zellen in die Leber, wie auch die Anzahl der regulatorischen Zellen keine Unterschiede erbracht hatten, sollte untersucht werden, ob die Unterschiede der Leberentzündung zwischen männlichen und weiblichen K14OVAp Empfängertieren auf unterschiedlichen Effektorfunktionen der T Zellen in Leber und Milz beruhen. Diese könnten eine besonders wichtige Rolle für die Ursache der geschlechtsspezifischen Unterschiede spielen. So konnte bereits beschrieben werden, dass Männer und Frauen unter anderem aufgrund ihrer Sexualhormone unterschiedliche Immunantworten induzieren. So fördern Androgene autoimmune Erkrankungen mit der Aktivierung von CD8+ T Zellen und der Ausprägung einer TH1 Antwort, wohingegen Östrogene durch die Aktivierung von B Lymphozyten autoimmune Erkrankungen, wie z.B. systemischer Lupus erythematosus (SLE), durch TH2 Antworten fördern [136, 137].

Die Analyse der Effektorfunktionen zeigte Unterschiede in der IFN γ Sekretion der Leberzellen auf. Dabei sezernierten die restimulierten Leberlymphozyten der K14OVAp Männchen nach Transfer von OT1 CD8+ T Zellen signifikant höhere Mengen an IFN γ im Vergleich zu den weiblichen K14OVAp Tieren (Abb.11). Eine genauere Analyse der

Immunzellen zeigte, dass sowohl die CD8⁺ T Zellen, wie auch die NKT Zellen der Leber von K14OVAp Männchen vermehrt IFN γ sezernierten (Abb.12). Interessant dabei war, dass der Anteil der IFN γ -produzierenden transferierten OT1 CD8⁺CD45.1 T Zellen in den Geschlechtern zwar gleich hoch war, der Anteil der IFN γ -produzierenden endogenen CD8⁺CD45.2⁺ T Zellen in den männlichen K14OVAp Tieren jedoch signifikant höher war im Vergleich zum Anteil der endogenen CD8⁺ T Zellen der K14OVAp Weibchen (Abb.13). Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen aus humanen *in vitro* Stimulationsversuchen, in denen isolierte T Zellen aus peripherem Blut von männlichen Spendern eine deutlich höhere TH1:TH2 Zytokinratio aufwiesen, verglichen mit Zellen aus weiblichen Spendern. Insbesondere zeigte sich dabei eine erhöhte IFN γ Produktion der männlichen Lymphozyten [138]. Da, wie bereits beschrieben, Sexualhormone einen entscheidenden Einfluss auf die Ausprägung von Immunantworten haben, stellte sich uns weiterhin die Frage, ob es möglich wäre, den Verlauf der Entzündung in den K14OVAp Tieren durch Vorbehandlung mit Sexualhormonen zu beeinflussen. So konnte bereits in einem murinen Modell des systemischen Lupus erythematosus (SLE) gezeigt werden, dass die Blockierung von Östrogen den Verlauf der Erkrankungen verbessern konnte [139]. Im Gegensatz dazu hatte im murinen autoimmunen Hepatitis Modell die Vorbehandlung mit Hormonen keinen Effekt auf den Verlauf der Erkrankung [128]. In dem hier untersuchten K14OVAp Modell zeigte sich, dass die Induktion der leberspezifischen Entzündung durch Sexualhormone beeinflussbar war. So führte die Kastration und Vorbehandlung mit Östrogen bei männlichen K14OVAp Tieren nach CD8⁺ T Zelltransfer zu einer histologisch nachweisbaren portalen Entzündung, wohingegen weibliche, mit Testosteron vorbehandelte K14OVAp Tiere, eine deutlich gemilderte Leberentzündung nach OT1 CD8⁺ T Zelltransfer aufwiesen (Abb.14). Die Veränderung in der Entzündungsantwort nach Vorbehandlung mit Hormonen war dabei unabhängig von der Rekrutierung der transferierten Zellen, wie die Analyse der transferierten OT1 CD8⁺CD45.1⁺ T Zellen zeigte (Abb.15). Ebenso zeigte sich, dass die Vorbehandlung mit Hormonen keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der Treg oder die Foxp3 Expression der CD4⁺ T Zellen in der Leber von männlichen und weiblichen K14OVAp Empfängertieren hatte (Abb.16). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit dem Mausmodell der autoimmunen Hepatitis, in welchem die Hormonbehandlung der Tiere ebenfalls keinen Einfluss auf die Anzahl der Treg hatte [128]. Dass die Behandlung mit Sexualhormonen einen Einfluss auf die Effektorantworten von Immunzellen hat, konnte bereits *in vitro* gezeigt werden. So führte die dauerhafte Stimulation mit Östrogen zu einer supprimierten NK Zellaktivität [140]. Auch unsere Ergebnisse wiesen Unterschiede in der Effektorantwort der Immunzellen nach Hormonbehandlung auf. So reduzierte die Kastration und Vorbehandlung mit Östrogen der K14OVAp Männchen die IFN γ Sekretion

der restimulierten Leberzellen (Abb.17), was sich auch in einem verringerten Anteil der IFN γ produzierenden CD8 $^+$ und NKT T Zellen in der Leber zeigte (Abb.18). In den Testosteron vorbehandelten K14OVAP Weibchen hingegen kam es zu einer signifikant gesteigert IFN γ Sekretion und einer Erhöhung des Anteils an IFN γ produzierenden CD8 $^+$ und NKT T Zellen in der Leber (Abb.17 und 18).

Besonders auffällig war, dass sich der Anteil der IFN γ -produzierenden endogenen CD8 $^+$ CD45.2 $^+$ T Zellen veränderte. So reduzierte sich der Anteil der IFN γ -produzierenden endogenen CD8 $^+$ CD45.2 $^+$ T Zellen durch Kastration und Vorbehandlung mit Östrogen signifikant im Vergleich zu den K14OVAp Männchen. In den mit Testosteron vorbehandelten Weibchen hingegen stieg im Vergleich zu den K14OVAp Weibchen der Anteil der IFN γ -produzierenden endogenen CD8 $^+$ CD45.2 $^+$ T Zellen signifikant an (Abb.19). Somit deuten die Ergebnisse insgesamt darauf hin, dass die transferierten OT1 CD8 $^+$ T Zellen zu gleichen Teilen in die Leber der männlichen und weiblichen Tiere einwandern und dort im gleichen Maß auf die Stimulation mit dem präsentierten Ovalbuminpeptid reagieren, indem sie IFN γ sezernieren. Unterschiede zeigen sich dabei in der Effektorfunktionen der endogenen T Zellen der männlichen und weiblichen K14OVAp Tiere, wobei diese in unserem Modell hormonell beeinflussbar sind.

Auch bei anderen autoimmunen Erkrankungen, wie der experimentalen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) und der kollagen-induzierten Arthritis (CIA), wurde vermutet, dass TH1 gerichtete Immunantworten verantwortlich sind für die Ausprägung der Erkrankung [141]. Eine Neutralisation oder eine genetische Defizienz von IFN γ in diesen Modellen verschlimmerte hingegen den Verlauf der Erkrankung [142]. Zudem wiesen die IFN γ defizienten Mäuse eine verschlechterte Genesung im Verlauf der EAE auf [143]. Sollte demnach auch in den männlichen K14OVAp Tieren eine überwiegend TH1 gerichtete Immunantwort die Tiere vor Induktion der Entzündung schützen, so wäre es gut möglich, dass in den weiblichen K14OVAp Tieren eine Hochregulation von TH2 Zytokinen für das Auslösen der Leberentzündung verantwortlich ist. Daher wurden, neben der Analyse des proinflammatorischen Zytokines IFN γ , noch weitere TH1 und TH2 Zytokine wie TNF α , IL-10, IL-6, IL-4 und IL-17 im Überstand der restimulierten Leberlymphozyten mittels ELISA gemessen (Daten nicht gezeigt). Die Schwankungen innerhalb der einzelnen Gruppen waren sehr hoch, so dass keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden konnten. Allerdings wiesen die Werte der weiblichen K14OVAp Tiere im Vergleich zu den männlichen K14OVAp Tieren eine deutliche Tendenz auf, höhere Mengen an IL-17 nach Restimulation der Leberlymphozyten zu sezernieren. Dieser Effekt konnte ebenfalls durch Hormonvorbehandlung beeinflusst werden. So zeigte sich eine tendenzielle Erhöhung der IL-17 Sekretion in den kastrierten und mit Östrogen

vorbehandelten Tiere und eine tendenzielle Erniedrigung dieser Zytokine in den mit Testosteron vorbehandelten K14OVAp Weibchen.

IL-17 wäre ein sehr interessanter Kandidat für die geschlechtsabhängige Induktion der Entzündung in den K14OVAp Tieren. So wurde ebenfalls in autoimmunen Erkrankungen, wie der Rheumatoiden Arthritis (RA), der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) und der T Zell vermittelten Colitis, IL-17 und IL-17 produzierende CD4+ T Zellen (TH17 Zellen) als wichtige Entzündungsmediatoren identifiziert [144, 145]. Zudem wurde ein Anstieg der IL-17 positiven Leberlymphozyten in PBC Patienten und in einem Mausmodell der PBC beschrieben [146]. Somit ist es von Interesse, die Population der leberinfiltrierenden Th17 Zellen auch in unserem Modell genauer zu analysieren. Zudem soll die Menge an IL-6, IL-23 und IL-21 ermittelt werden, da die TH17 Differenzierung abhängig ist von der STAT3 Aktivierung dieser Zytokine zusammen mit TGF β und IL-1 β [147].

Mit der Etablierung des K14OVAp Modell können wir somit ein induzierbares geschlechtsabhängiges Mausmodell einer biliären Cholangitis beschreiben, welches beeinflussbar durch Sexualhormone ist. Das Modell weist ein hohes Potential auf, als neues Mausmodell der PBC zu dienen. So zeigt es einige Parallelen zur humanen Erkrankung auf. Die PBC beim Menschen ist gekennzeichnet durch die chronische Destruktion der kleinen intrahepatischen Gallengänge mit umgebender portaler lymphozytärer Infiltration [11, 12] und auch im K14OVAP Modell richtet sich die Entzündung in der Leber durch die Expression des Ovalbuminpeptids primär gegen das Gallengangsepithel. Dies zeigt sich auch histologisch durch peribiliäre und periportale Infiltrate. Zudem weisen 50% der K14OVAp Weibchen AMA Antikörper auf. Die Detektion von AMA im humanen Serum ist ein wichtiges Kriterium der Diagnose einer PBC beim Menschen und kann mit unter bereits Jahre vor klinischen Symptomen die Erkrankung prognostizieren [148]. Besonders entscheidend ist aber, dass, im Gegensatz zu den bereits etablierten Mausmodellen, das K14OVAp Modell geschlechtsspezifische Unterscheide aufweist, die der humanen Erkrankungsrate entspricht [12, 32]. Durch die Möglichkeit, die Erkrankung im adulten Tier durch Zelltransfer zu induzieren, ist es somit möglich, frühe Prozesse in der Entstehung einer autoimmun bedingten portalen Entzündung zu analysieren und zu verstehen.

Neben den genannten Charakteristika ist die PBC beim Menschen aber vor allem durch ihren chronischen Verlauf gekennzeichnet, der letztendlich zu Zirrhose und Leberversagen führen kann [11, 12]. Daher ist die Weiterentwicklung des K14OVAp Modells hin zu einem chronisch verlaufenden Entzündungsmodells von besonderem Interesse. Hierfür sollen wiederholte Zelltransfersversuche von transgenen OT1 CD8+ T Zellen in K14OVAp Empfängertiere durchgeführt werden. Die Anzahl der transferierten

Zellen soll dabei deutlich reduziert werden, um die Überlebensrate der K14OVAp Empfängertiere zu steigern. Sollte es uns durch wiederholten Zelltransfer gelingen, fibrotische Umbauprozesse in den Lebern der K14OVAp Tieren zu induzieren, so wäre das beschriebene Modell gut geeignet für die Untersuchung der frühen Prozesse und des chronischen Verlaufs einer autoimmun bedingten portalen Entzündung.

Neben der PBC gilt die Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC) als weitere autoimmune Lebererkrankung. Die Primär Sklerosierende Cholangitis ist eine chronisch verlaufende cholestatische Lebererkrankung, welche charakterisiert ist durch konzentrische und obliterative Fibrose der intra- und/oder extrahepatischen Gallengänge und eine lymphozytäre Entzündung des Portalfeldes. Dies führt zu Cholestase, Cholangitis und Zirrhose [17]. Untypisch für eine autoimmune Erkrankung ist, dass Männer zweimal häufiger betroffen als sind als Frauen [22, 23]. Als Mausmodell der PSC konnte bereits die MDR2^{-/-} Maus beschrieben werden. Die Tiere entwickeln aufgrund einer gerichteten Deletion des MDR2 (Abcb4) Gens der Phospholipid-Flipase spontan eine sklerosierende Cholangitis mit makroskopischen und mikroskopischen Eigenschaften der humanen PSC, wie extra- und intrahepatische biliäre Stenose, konzentrische periduktale Fibrose und fokale Obliteration der Gallengänge [37]. Da es sich beim MDR2^{-/-} Modell bereits um ein gut etabliertes und charakterisiertes Modell handelt, wollten wir genauer analysieren, ob sich auch hier geschlechtsspezifische Unterschiede aufzeigen. Bereits beschrieben wurden geschlechtsspezifische Unterschiede in den MDR2^{-/-} Tieren in einem Modell, in welchem die MDR2^{-/-} Tiere mit Gallensalz versetztes Futter erhielten. Hier wiesen die weiblichen Tiere eine deutlich stärkere histologische Schädigung im Vergleich zu den männlichen MDR2^{-/-} Tieren auf [149]. Ob die MDR2^{-/-} Tiere jedoch per se geschlechtsspezifische Unterschiede aufweisen, wurde nicht weiter analysiert. Unsere Analyse zeigte deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede in den unbehandelten MDR2^{-/-} Tieren. So wiesen die MDR2^{-/-} Weibchen im Vergleich zu den männlichen MDR2^{-/-} Tieren im zeitlichen Verlauf signifikant erhöhte Serumtransaminasen auf (Abb.20). Die erhöhten Transaminasenwerte der weiblichen MDR2^{-/-} manifestierten sich zudem in einer verstärkten Leberschädigung in diesen Tieren im Vergleich zu der männlichen Gruppe, was sich histologisch durch H&E Färbung zur Ermittlung des Entzündungsgrades und einer Sirius Rot Färbung zur Bestimmung der Fibrose-Entwicklung nachweisen ließ (Abb.21). Das MDR2^{-/-} Modell entspricht demnach nicht den humanen Erkrankungsraten, in welchem Männer ein zweifach höheres Risiko aufweisen, an PSC zu erkranken, als Frauen [22, 23]. Somit müssen die geschlechtsspezifischen Unterschiede im MDR2^{-/-} Modell im direkten Bezug auf die PSC Erkrankung unter Vorbehalt analysiert werden. Allerdings handelt es sich bei diesem Modell um einen primär nicht autoimmun bedingten Leberschaden. Somit bietet uns das MDR2^{-/-}

Mausmodell trotzdem die Möglichkeit, generelle geschlechtsspezifische Unterschiede in der Entstehung von Entzündungsprozessen in der Leber zu untersuchen. Daher ist des Weiteren in diesem Modell geplant, eine Analyse der regulatorischen T Zellen und deren Effektorfunktionen durchzuführen. Zudem soll der Einfluss der Vorbehandlung mit Sexualhormonen Aufschluss darüber geben, ob auch in diesem Modell die Ausprägung der Entzündung hormonell beeinflussbar ist.

4.2 Wiederherstellung der immunologischen Toleranz in der Leber durch den Transfer von regulatorischen T Zellen (Treg)

Nach der erfolgreichen Etablierung der Mausmodelle entzündlicher Lebererkrankungen, stellten wir uns die Frage, ob es uns gelänge, die immunologische Toleranz in der Leber durch den Transfer von Treg wiederherzustellen, da die Applikation von regulatorischen T Zellen ein attraktives therapeutisches Konzept darstellt. So konnte bereits im Tiermodell des Typ I Diabetes in der Nonobese diabetic (NOD) Maus der erfolgreiche adoptive Treg Transfer nachgewiesen werden [113, 114]. Wir führten zunächst adoptive Treg Transferversuche in dem primär nicht autoimmun bedingten Leberentzündungsmodell der MDR2^{-/-} Tiere durch. Die Versuche zeigten, dass der adoptive Transfer von FVB WT Treg, ebenso wie der Transfer von eventuell voraktivierten nTreg aus MDR2^{-/-} Tieren, keinen Einfluss auf den Verlauf der entzündlichen sklerosierende Cholangitis in den Empfängertieren hatte (Abb.24 und 25).

Es stellte sich die Frage, ob die transferierten Treg geeignet genug waren, um ihre regulatorische Funktion *in vivo* auszuüben, und ob eine Erhöhung der Anzahl oder eine Steigerung der Funktionalität der endogenen Treg der MDR2^{-/-} Tiere die Entzündungsreaktion positiv beeinflussen könnte. Hierfür sollte die Wirkung des Immunsuppressivums Rapamycin, welches häufig nach Organtransplantationen eingesetzt wird, getestet werden [150, 151]. Es zeigte sich dabei, dass Rapamycin zum Einen die Konversion von Alloantigen-spezifischen Tregs fördert [152] und zum Anderen die Expansion von nTreg, nicht aber konventionellen T Zellen begünstigt [131]. Diese Eigenschaften machen Rapamycin zu einem interessanten Mittel, welches potentiell die Entstehung von Immuntoleranz fördern kann.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass die alleinige Gabe des Immunsuppressivums Rapamycin sich bereits positiv auf die Entzündungsreaktion der MDR2^{-/-} Tiere auswirkte und eine Reduktion der Serumtransaminasen bewirkte (Abb.26). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der eigentlichen Verwendung von Rapamycin als wirksames Immunsuppressivum. Dabei vermittelt Rapamycin seine immunsuppressive Wirkung vor

allem über antiproliferative, antiangiogenetische Eigenschaften [153]. Der zusätzliche Transfer von nTreg unter Rapamycingabe im MDR2^{-/-} Modell führte jedoch zu keiner zusätzlichen Entzündungshemmung in der Leber der Empfängertiere. Er hatte im Gegenteil eine Erhöhung der Serumtransaminasen zur Folge und damit einhergehend einen histologisch nachweisbaren, signifikant erhöhten Entzündungsgrad im Vergleich zu den MDR2^{-/-} Tieren, welche ausschließlich Rapamycin erhalten hatten (Abb.27 und 28). Die Ursachen für die Erhöhung der Serumtransaminasen und des histologisch nachweisbaren Entzündungsgrades nach Treg Transfer sind dabei noch vollkommen unklar.

Um zu überprüfen, ob die Rapamycingabe überhaupt einen Effekt auf die regulatorischen Zellen in den MDR2^{-/-} Tieren zeigte, wurde eine durchflusszytometrische Analyse der regulatorischen T Zellen in der Milz durchgeführt. Es zeigte sich, dass Rapamycin eine Erhöhung in der Treg Anzahl der Milz in den behandelten Tieren induzierte (Abb.29a). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass im peripheren Blut von nierentransplantierten Patienten unter Monotherapie mit Rapamycin eine erhöhte Anzahl an Treg vorliegt [154]. Eine Analyse der CD3/Foxp3 T Zellen in der Leber zeigte jedoch keine Unterschiede in der Anzahl der Treg nach Rapamycingabe auf (Abb.29b), was darauf hindeutet, dass die Anzahl der regulatorischen T Zellen in der Leber der erkrankten Tiere nicht durch Rapamycingabe gesteigert werden konnte. Ob die Funktionalität der Treg durch Rapamycin beeinflusst werden konnte, soll mittels *in vitro* Suppressionsversuchen mit isolierten Treg aus Milz und Leber der MDR2^{-/-} Tiere untersucht werden.

Da es sich beim MDR2^{-/-} Modell um ein chronisches Modell handelt, und die Tiere dauerhaft den Entzündungsreizen ausgesetzt sind, wurde der Treg Transfer in einem weiteren, primär nicht autoimmun bedingten, jedoch induzierbaren Modell einer Leberschädigung untersucht. Es zeigte sich, dass auch im Modell der DDC-induzierten Gallengangsschädigung der alleinige Transfer von nTreg nicht ausreichte, um einen Einfluss auf die bestehende portale Entzündung zu nehmen (Abb.30). Zwar konnte die Gabe von Rapamycin auch in diesem Modell die Entzündungsreaktion verringern, doch verbesserte der zusätzliche Transfer von Treg auch hier den Rapamycin bedingten Effekt nicht weiter (Abb.31).

Die Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass der Transfer von Treg in den Modellen der primär nicht autoimmun bedingten Leberentzündung keinen Einfluss zu haben schien. Es sollte daher untersucht werden, ob der Treg Transfer einen Einfluss auf eine primär antigenspezifisch induzierte Leberentzündung (K14OVA_p) haben könnte. So konnte bereits gezeigt werden, dass durch den Transfer von antigenspezifischen Treg ein vollständiger Schutz vor der Auslösung einer Enzephalomyelitis im EAE Modell vermittelt

werden konnte [155]. Im Antigen-induzierten K14OVAp Modell erbrachte der Kotransfer von OT1 CD8+ T Zellen zusammen mit frisch isolierten C57BL/6 WT Treg jedoch keine signifikante Änderung der Serumtransaminasen. Anstelle der erwarteten Reduktion war sogar eine leichte Tendenz zu höheren GPT Werten zu beobachten (Abb.32). Die Vermutung war, dass die frisch isolierten WT Treg nicht ausreichend funktional waren, um einen Einfluss auf die portale Leberentzündung der K14OVAp Tiere zu nehmen. Daher wurden Treg aus hCD2-TGF β 1 isoliert, welche bereits in einem Asthmodell die Empfängertiere vor einer Atemwegshyperreagibilität (AHR) schützen konnten, während aus C57Bl/6 Tieren isolierte WT Treg dazu nicht in der Lage waren [129]. Doch auch der Transfer von hCD2-TGF β 1 nTreg, welche aktives TGF β 1 T Zell spezifisch überexprimieren, erbrachte keine signifikante Änderung der Serumtransaminasen nach OT1 Transfer. Es fiel hingegen erneut auf, dass es nach Treg Transfer zu einer leichten Erhöhung der GPT Werte kam (Abb.33).

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass auch in dem K14OVAp Modell der Antigen-induzierten portalen Entzündung der Transfer von regulatorischen T Zellen keinen Einfluss auf die Wiederherstellung der immunologischen Toleranz der Leber hatte. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass es sich zwar um eine primär antigenspezifisch induzierte Entzündung handelte, dass aber die transferierten Treg selbst nicht antigenspezifisch waren. Dass aber gerade die Antigen-spezifität der Treg bei Transferversuchen von entscheidender Bedeutung ist, zeigte sich im murinen Typ1 Diabetes Modell. Hier führte der Transfer von 10^5 Inselzell-spezifischen Treg zu einem effektiven Schutz der Tiere vor Erkrankung, während der Transfer von 10^6 nicht-spezifischen Treg nicht schützen konnte [156].

Insgesamt zeigen die durchgeführten Transferversuche, dass der Treg Transfer weder in den Modellen der primär nicht autoimmun bedingten Leberentzündung (MDR2 $^{-/-}$ und DDC), noch der antigenspezifischen portalen Entzündung (K14OVAp) zu einer Wiederherstellung der immunologischen Toleranz führte. Es zeigte sich im Gegenteil sowohl im MDR2 $^{-/-}$, wie auch dem K14OVAp Modell eine tendenzielle Verschlechterung der Leberpathologie nach Treg Transfer.

Die Ursachen für die Erhöhung der Serumtransaminasen nach Treg Transfer sind noch vollkommen unklar. So bleiben einige Fragen offen:

1) Gelangen die transferierten Treg in ausreichender Menge an den Ort der Entzündung oder werden sie bereits vor Ausübung ihrer regulatorischen Eigenschaften vom Immunsystem des Empfängertieres abgebaut?

Das Rekrutierungsverhalten von Treg ist dabei von besonderem Interesse. So ist die Expression von Chemokinrezeptoren und Integrinen verantwortlich für die Rekrutierung

von Treg in lymphatische Organe oder in periphere Gewebe [157]. Als Marker für die Migration von T Zellen in entzündetes Gewebe konnte das Integrin alpha4beta7 identifiziert werden [158]. Die Erhöhung von solchen Markern könnte die Rekrutierung auch in die entzündete Leber begünstigen. Daher ist vorgesehen, die frisch isolierten nTreg vor Transfer mit Retinsäure (RA) zu stimulieren, da diese eine Hochregulierung von Integrin alpha4beta7 bewirken konnte [159].

2) Behalten die Treg ihren regulatorischen Phänotyp auch nach Transfer bei oder rekonvertieren die transferierten Treg zu T Zellen mit entzündlicher Effektorfunktion? Dass die Programmierung von Foxp3+ Treg Zellen nicht so unveränderlich wie bisher vermutet ist, zeigen neuere Berichte über die Plastizität dieser Zellen. So konnten einige *in vitro* und *in vivo* Versuchen zeigen, dass nTreg Zellen die Fähigkeit haben, zu TH17 Zellen zu konvertieren. Demnach führte die Zugabe von IL-6 während der *in vitro* Aktivierung von nTreg zu einer teilweisen Umdifferenzierung der Treg zu TH17 Zellen [160] und auch *in vivo* wurde die Konversion von nTreg in IL-17 produzierende Zellen unter Einfluss eines proinflammatorischen Milieus beschrieben [161, 162]. Um diese Fragen zu beantworten, sollen in Zukunft Treg Transferversuche mit kongenen CD45.1+ Treg aus Foxp3-green fluorescent protein (GFP) Reporter Mäusen [65] durchgeführt werden. Diese Tiere exprimieren GFP unter dem Foxp3 Promotor. Anhand des kongenen Allels CD45.1 können somit die transferierten Zellen *in vivo* detektiert werden und das Rekrutierungsverhalten der Zellen überprüft werden. Zudem gibt die GFP gekoppelte Expression von Foxp3 Auskunft darüber, ob die transferierten Zellen nach wie vor ihren regulatorischen Phänotyp besitzen oder nicht.

4.3 Weiterentwicklung der *in vitro* Konversion von CD4+CD25- T Zellen zu stabilen iTreg

Da endogene Treg bei autoimmunen Erkrankungen häufig in verminderter Anzahl vorliegen oder eine gestörte Funktionalität aufweisen, könnte der Transfer von *ex vivo* generierten iTreg von therapeutischem Interesse sein [163]. In Mausmodellen konnte bereits gezeigt werden, dass eine suboptimale polyklonale TCR Stimulation von CD4+CD25-Foxp3- T Zellen mit IL-2 und TGFβ iTreg generiert, welche protektive Effekte bei autoimmun bedingtem Diabetes [164], experimenteller autoimmuner Enzephalitis [165] und Myasthenia gravis [166] vermitteln. Dabei ist die Konversion von CD4+CD25-Foxp3- T Zellen hin zu CD4+CD25+Foxp3+ T Zellen abhängig von TGFβ [75, 77]. Auch in unseren Versuchen zeigte sich, dass die Zugabe von exogenem TGFβ zu einer signifikanten Erhöhung der Konversionsraten von CD4+CD25-Foxp3- T Zellen hin zu CD4+CD25+Foxp3+ T Zellen führte, und dass die Konversionsrate dabei abhängig von

der Konzentration an zugegebenem TGF β war (Abb.35 und 36). Es stellte sich uns daher die Frage, ob es weitere Substanzen gibt, welche in der Lage sind die Konversionsrate zu steigern. So konnte bereits eine TGF β abhängige Steigerung der Konversionsrate durch Retinsäure (RA) [130] und in humanen Zellen durch Rapamycin [134] beschrieben werden. Auch unsere Ergebnisse zeigten, dass Retinsäure und Rapamycin die TGF β -abhängige Konversionsrate signifikant erhöhen konnten. TGF β unabhängig konnten jedoch weder Retinsäure noch Rapamycin eine Konversion der Zellen induzieren (Abb.37, 38 und 39). Zusätzlich testeten wir die Konversion unter Zugabe von Azathymidin, welches in humanen T Zellen ebenfalls TGF β -abhängig die Konversionsrate erhöhen konnte [167]. Die Versuche zeigten jedoch, dass durch die Zugabe von Azathymidin keine weitere Steigerung der Konversionsrate in den murinen T Zellen erreicht werden konnte (Abb.40). Wir wollten anschließend überprüfen, ob eine Kombination der einzelnen Substanzen eine Steigerung der Konversionsrate bewirken könnte. Dabei zeigte sich, dass weder die Kombination aus Rapamycin und Azathymidin, noch die Kombination aus Rapamycin und Retinsäure die TGF β -abhängige Konversionsrate weiter verbessern konnte (Abb.41 und 42).

Neben der Induktion und der Steigerung der Konversionsrate war für uns vor allem die Stabilität der *in vitro* konvertierten Zellen von entscheidender Bedeutung. So ist der Erhalt der Foxp3-Expression nach Konversion Voraussetzung für die regulatorische Funktionalität der Zellen und die mögliche therapeutische Applikation der iTreg *in vivo*. In den bisherigen Berichten wurde ein schneller Verlust der Foxp3 Expression von iTreg nach Konversion in Abwesenheit von TGF β beschrieben [84]. Um festzustellen, welchen Einfluss die Konversion auf die Stabilität der mit TGF β -induzierten iTreg im Vergleich zu den mit TGF β und Rapamycin induzierten iTreg hatte, wurden die konvertierten iTreg mehrfach restimuliert und in Hinblick auf ihre Foxp3 Expression analysiert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Konversion mit TGF β unter Zugabe von Rapamycin iTreg generiert, welche wesentlich stabiler ihre Foxp3 Expression aufrecht erhalten können als iTreg, welche alleine mit TGF β generiert wurden (Abb.43 und 44). Somit scheint Rapamycin eine wichtige Rolle bei der Induktion stabiler *in vitro* generierter iTreg zu spielen. Die Instabilität von *in vitro* generierte Treg im Vergleich zu *in vivo* generierten Treg manifestiert sich vor allem in unterschiedlicher Demethylierung des Foxp3 Locus. So weisen *in vivo* generierten iTreg und nTreg deutlich stärkere Demethylierungen in diesem Bereich auf [89]. Um festzustellen, ob auch die Stabilität der Foxp3 Expression nach Konversion unter Zugabe von Rapamycin auf einer erhöhten Demethylierung im Foxp3 Locus beruht, sollen Demethylierungsanalysen der konvertierten Zellen durchgeführt werden. Zusätzlich soll der Einfluss von Retinsäure auf die Stabilität und die Demethylierung der iTreg nach Restimulation überprüft werden. Ebenso soll der Einfluss

von Azathymidin in Bezug auf die Stabilität der Zellen analysiert werden. Auch wenn die Zugabe von Azathymidin keine Steigerung der Konversionsrate bewirken konnte, so konnte bereits gezeigt werden, dass für die stabile Foxp3 Expression *in vitro* konvertierter Treg eine effiziente DNA Demethylierung durch Nukleosidanaloga von entscheidender Bedeutung ist [89]. Auch bei Azathymidin handelt es sich um ein Nukleosidanalogon, welches während des Replikationszyklus in die DNA integriert werden kann. Dieser Einbau beeinträchtigt die Funktion der DNA Methyltransferase 1, was schließlich zur Demethylierung der DNA führt [168].

5. Ausblick

a) Mausmodelle portaler Entzündungen

In Bezug auf das K14OVAp Mausmodell soll dieses noch weiter dem humanen PBC Erkrankungsverlauf angepasst werden. Hierfür soll eine Weiterentwicklung des Modells hin zu einem chronisch verlaufenden Entzündungsmodells versucht werden. Durch wiederholte Zelltransferversuche von transgenen OT1 CD8+ T Zellen in K14OVAp Empfängertiere soll eine dauerhafte Leberentzündung entstehen, welche letztlich fibrotische Umbauprozesse induzieren soll. Des Weiteren ist eine weiterführende Analyse der endogenen T Zellen und deren Effektorfunktionen geplant. So weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass die Effektorfunktionen der endogenen Zellen geschlechtsabhängig unterschiedlich gesteuert werden, und dass diese Regulation abhängig von Sexualhormonen ist. Unklar ist jedoch immer noch, welche Effektorfunktionen in den weiblichen K14OVAp Tieren letztendlich die portale Entzündung induzieren und welche die Toleranz in den männlichen K14OVAp Tieren vermitteln. Hierfür sollen Zytokinprofile in den männlichen und weiblichen K14OVAp Tieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Zelltransfer erstellt werden. Es bietet sich zudem an, die Ergebnisse mit den Effektorfunktionen in den MDR2^{-/-} Tieren zu vergleichen, da sich auch hier eine höhere Suzeptibilität der Weibchen zeigte. Auch hier könnten geschlechtsabhängige Unterschiede in den Effektorfunktionen der endogenen Zellen verantwortlich sein für die verstärkte Immunantwort in den weiblichen Tieren. Zusätzlich soll eine Analyse der Effektorfunktionen humaner Proben durchgeführt werden. Um festzustellen, ob auch beim Menschen Unterschiede in den Effektorfunktionen von Leberlymphozyten bei Männern und Frauen auftreten, sollen daher humane Leberlymphozyten aus überschüssigem Biopsiematerial isoliert und *in vitro* genauer analysiert werden. Des Weiteren ist die Funktionalität der regulatorischen T Zellen in den Mausmodellen noch nicht geklärt. Hierfür sollen Suppressionsversuche mit Treg, welche aus der Milz und der Leber isoliert werden, *in vitro* durchgeführt werden. Insgesamt könnten somit im K14OVAp Modell die Auswirkungen hormoneller Behandlungen auf die Entstehung, die Ausprägung und den Verlauf der Erkrankung analysiert werden und mit den Ergebnissen aus dem MDR2^{-/-} Modell und den *in vitro* Versuchen mit humanen Zellen verglichen werden.

Langfristig ist in Planung, ein weiteres transgenes Mausmodell zu generieren, welches das SIINFEKL Peptid ausschließlich über einen Gallengang-spezifischen Promoter exprimiert. Zwar zeigen sich die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der K14OVAp Maus nur in der Leber, doch durch die Expression des Ovalbuminpeptids auch in anderen

Organen entwickeln die Tiere stets auch extrahepatische Entzündung. Dies führt zum Einem zu einer erhöhten Sterblichkeitsrate der Tiere, was die Induktion eines chronischen Verlauf erschwert und zum Anderen könnten die Immunantworten in der Leber, durch die Entzündung anderer Organe beeinflusst werden.

b) Treg Transfer

Auch wenn die Treg Transferversuche bisher keinen Effekt auf die Leberentzündung der Tiere hatte, sondern im Gegenteil eine tendenzielle Verschlechterung der Leberpathologie bewirkten, sollen die Effekte des Treg Transfers weiter analysiert werden. In Zukunft sollen daher Transferversuche mit kongenen CD45.1+ Treg aus Foxp3-green fluorescent protein (GFP) Reporter Mäusen [65] durchgeführt werden. Dies ermöglicht uns, die transferierten Zellen *in vivo* zu detektieren und das Rekrutierungsverhalten der Zellen zu überprüfen. Zudem soll untersucht werden, ob sich durch z.B. die Hochregulierung von Integrinen oder Chemokinen, die Rekrutierung der Treg in die Leber begünstigen lässt. Des Weiteren soll untersucht werden, ob sich durch die Art der Applikation der Treg, wie z.B. intraperitoneale Gabe versus intravenöse Treg Gabe, Unterschiede in der Rekrutierung der Zellen ergeben. Neben der Rekrutierung der Zellen ermöglicht uns die Foxp3 abhängige Expression von GFP auch eine Analyse der regulatorischen Funktion der transferierten Zellen *in vivo*. So sollen die transferierten Treg anhand des CD45.1 Allels wieder aus den transferierten Tieren (re)isoliert werden. Dies ermöglicht zum Einen eine Analyse der Treg Funktionalität im Suppressionsversuch, und zum Anderen gibt es Aufschluss darüber, wie viele Zellen nach wie vor regulatorische Eigenschaften besitzen, oder ob die transferierten Treg zu T Zellen mit entzündlicher Effektorfunktion werden.

c) *In vitro* Konversion

Es soll versucht werden, die Stabilität der *in vitro* generierten Treg zu erhöhen. Hierzu soll zunächst die Stabilität nach Restimulation von iTreg, die unter Zugabe von Retinsäure und Azathymidin generiert wurde, überprüft werden. Im Anschluss daran sollen Demethylierungsanalysen Auskunft über die Stabilität der konvertierten Zellen geben. Zudem wurde bereits mehrfach beschrieben, dass TGF β - induzierte Foxp3+ T Zellen eine hohe immunsuppressive Kapazität *in vitro* und *in vivo* aufweisen konnten [75, 77, 83]. Da sich die TGF β -abhängige Konversion unter Zugabe von Rapamycin als sehr stabil erwiesen hat, sollen zunächst *in vitro* Suppressionsversuche mit diesen iTreg durchgeführt werden, um die Funktionalität der Zellen zu überprüfen.

Des Weiteren soll dann *in vivo* der Effekt der mit Rapamycin konvertierten iTreg in Modellen überprüfen werden, in welchen der schützende Effekt des adoptiven nTreg Transfers bereits beschrieben werden konnte [169, 170]. Daher sollen die mit Rapamycin konvertierten iTreg im Vergleich zu frisch isolierten nTreg in den Modellen der DSS induzierten Colitis und im ConA Modell untersucht werden. Durch Konversion kongener iTreg ist es uns zudem möglich, die Zellen nach Transfer erneut zu isolieren, um zu überprüfen, ob es zu einer Rekonversion der Zellen *in vivo* kam oder ob sie ihre Foxp3 Expression stabil aufrechterhalten konnten.

6. Zusammenfassung

Die Pathogenese cholestatischer autoimmuner Lebererkrankungen, wie der PBC und der PSC sind weitgehend unklar, und es gibt zur Zeit keine spezifische Therapie für diese Erkrankungen. Das Ziel der Arbeit war daher die Etablierung und Charakterisierung neuer Mausmodelle der portalen Leberentzündung und die Überprüfung der therapeutische Wirksamkeit eines adoptiven Transfers von regulatorischen T Zellen in diesen Modellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde als Mausmodell einer Antigen-spezifischen portalen Entzündung das transgene K14OVAp Mausmodell etabliert. Durch Transfer von OT1 CD8⁺ T Zellen ist es gelungen, in den K14OVAp Tieren eine portale Entzündung zu induzieren. Dabei zeigte sich, dass das Modell geschlechtsabhängige Unterschiede aufweist, welche der humanen Erkrankungsrate der PBC entsprechen und welche durch Sexualhormone beeinflussbar sind. So induzierte der OT1 CD8⁺ T Zelltransfer in den K14OVAp Weibchen eine Entzündung in der Leber mit peribiliären und periportalen Infiltraten, und 50% der K14OVAp Weibchen wiesen AMA Antikörper auf. Bei den männlichen K14OVAp Tieren hingegen prägte sich keines dieser Merkmale nach OT1 CD8⁺ T Zelltransfer aus. Die geschlechtsspezifischen Unterschiede beruhten dabei nicht auf einer veränderten Anzahl der regulatorischen Zellen. Vielmehr zeigten sich deutliche Unterschiede in den Effektorantworten der endogenen Leberzellen in den K14OVAp Empfängertieren. Anders als bei bisher beschriebenen Tiermodellen der PBC, zeigt das K14OVAp Modell somit deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede in Suszeptibilität und Ausprägung der Immunpathologie, die denen der humanen Erkrankung entsprechen. Da das K14OVAp Modell zudem im adulten Tier induzierbar ist, erscheint es geeignet, als Modell der PBC zu dienen.

Als weiterer Aspekt dieser Arbeit wurde der therapeutische Effekt adoptiv transferierter regulatorischer T Zellen (Treg) auf cholestatische Lebererkrankungen in verschiedenen Modellen mit unterschiedlichen Manifestationsformen untersucht. Hierfür wurden frisch isolierte Treg adoptiv in Mausmodelle primär Antigen-unspezifischer (MDR2^{-/-} und DDC) und Antigen-spezifischer (K14OVAp) Entzündung transferiert. Die Versuche zeigten, dass der Treg Transfer weder in den Modellen der primär nicht autoimmun bedingten Leberentzündung, noch der antigenspezifischen portalen Entzündung zu einer verminderten Immunpathologie führte.

Da nTreg nur in geringer Zahl im peripheren Blut vorkommen, aber für eine therapeutische Applikation eine ausreichende Menge von Zellen zur Verfügung stehen muss, wurde zudem die *in vitro* Konversion CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T Zellen zu stabilen CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ iTreg weiterentwickelt und optimiert. Hierbei zeigte sich, dass die TGFβ-abhängige Konversion durch Zugabe von Rapamycin und Retinsäure signifikant

gesteigert werden konnte. Zudem wurden durch die Zugabe von Rapamycin iTreg generiert, welche wesentlich stabiler ihre Foxp3 Expression aufrecht erhalten konnten, als iTreg, welche alleine mit TGF β generiert wurden. Es bleibt zu untersuchen, inwieweit die *in vitro* generierten iTreg auch *in vivo* nach Transfer eine stabile suppressive Funktionalität bewahren, und somit für eine Therapie entzündlicher Lebererkrankungen geeignet sind.

Zusammenfassend konnte mit der Etablierung des K14OVAp ein induzierbares und geschlechtsabhängiges Mausmodell einer biliären Cholangitis entwickelt werden, welches beeinflussbar durch Sexualhormone ist. Es ermöglicht, frühe Prozesse in der Entstehung einer autoimmun bedingten portalen Entzündung zu analysieren und zu verstehen. Der Transfer von regulatorischen Zellen war in der bisherigen Form nicht geeignet, die Leberentzündung in verschiedenen Modellen zu hemmen. Hier bedarf es weiterer Analysen, um die therapeutische Effizienz des Transfers von Treg zu verbessern.

7. Referenzen

1. Boberg KM, Aadland E, Jahnsen J, Raknerud N, Stiris M, Bell H. Incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, and autoimmune hepatitis in a Norwegian population. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:99-103.
2. Krawitt EL. Autoimmune hepatitis. *N Engl J Med* 2006;354:54-66.
3. Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging.1. *Hepatology* 1994;19:1513-20.
4. Czaja AJ. Behavior and significance of autoantibodies in type 1 autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999;30:394-401.
5. Homberg JC, Abuaf N, Bernard O, et al. Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type 1: a second type of "autoimmune" hepatitis. *Hepatology* 1987;7:1333-9.
6. Manns M, Gerken G, Kyriatsoulis A, Staritz M, Meyer zum Buschenfelde KH. Characterisation of a new subgroup of autoimmune chronic active hepatitis by autoantibodies against a soluble liver antigen. *Lancet* 1987;1:292-4.
7. Stechemesser E, Klein R, Berg PA. Characterization and clinical relevance of liver-pancreas antibodies in autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1993;18:1-9.
8. Kanzler S, Lohr H, Gerken G, Galle PR, Lohse AW. Long-term management and prognosis of autoimmune hepatitis (AIH): a single center experience. *Z Gastroenterol* 2001;39:339-8.
9. Soloway RD, Summerskill WH, Baggenstoss AH, et al. Clinical, biochemical, and histological remission of severe chronic active liver disease: a controlled study of treatments and early prognosis. *Gastroenterology* 1972;63:820-33.
10. Bergasa NV. Pruritus and fatigue in primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis* 2003;7:879-900.
11. Feld JJ, Heathcote EJ. Epidemiology of autoimmune liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:1118-28.
12. Kaplan MM, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 2005;353:1261-73.
13. Fussey SP, Guest JR, James OF, Bassendine MF, Yeaman SJ. Identification and analysis of the major M2 autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:8654-8.
14. Yeaman SJ, Fussey SP, Danner DJ, James OF, Mutimer DJ, Bassendine MF. Primary biliary cirrhosis: identification of two major M2 mitochondrial autoantigens. *Lancet* 1988;1:1067-70.
15. Gershwin ME, Ansari AA, Mackay IR, et al. Primary biliary cirrhosis: an orchestrated immune response against epithelial cells. *Immunol Rev* 2000;174:210-25.

16. Kita H, Matsumura S, He XS, et al. Quantitative and functional analysis of PDC-E2-specific autoreactive cytotoxic T lymphocytes in primary biliary cirrhosis. *J Clin Invest* 2002;109:1231-40.
17. Gershwin ME, Selmi C, Worman HJ, et al. Risk factors and comorbidities in primary biliary cirrhosis: a controlled interview-based study of 1032 patients. *Hepatology* 2005;42:1194-202.
18. Selmi C, Gershwin ME, Lindor KD, et al. Quality of life and everyday activities in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2007;46:1836-43.
19. Corpechot C, Chretien Y, Chazouilleres O, Poupon R. Demographic, lifestyle, medical and familial factors associated with primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2010;53:162-9.
20. Prince MI, Ducker SJ, James OF. Case-control studies of risk factors for primary biliary cirrhosis in two United Kingdom populations. *Gut* 2010;59:508-12.
21. Hirschfield GM, Heathcote EJ, Gershwin ME. Pathogenesis of cholestatic liver disease and therapeutic approaches. *Gastroenterology* 2010;139:1481-96.
22. Aoki CA, Bowlus CL, Gershwin ME. The immunobiology of primary sclerosing cholangitis. *Autoimmun Rev* 2005;4:137-43.
23. Borchers AT, Shimoda S, Bowlus C, Keen CL, Gershwin ME. Lymphocyte recruitment and homing to the liver in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Semin Immunopathol* 2009;31:309-22.
24. Saich R, Chapman R. Primary sclerosing cholangitis, autoimmune hepatitis and overlap syndromes in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008;14:331-7.
25. Karlsen TH, Schruppf E, Boberg KM. Genetic epidemiology of primary sclerosing cholangitis. *World J Gastroenterol* 2007;13:5421-31.
26. LaRusso NF, Shneider BL, Black D, et al. Primary sclerosing cholangitis: summary of a workshop. *Hepatology* 2006;44:746-64.
27. Irie J, Wu Y, Wicker LS, et al. NOD.c3c4 congenic mice develop autoimmune biliary disease that serologically and pathogenetically models human primary biliary cirrhosis. *J Exp Med* 2006;203:1209-19.
28. Koarada S, Wu Y, Fertig N, et al. Genetic control of autoimmunity: protection from diabetes, but spontaneous autoimmune biliary disease in a nonobese diabetic congenic strain. *J Immunol* 2004;173:2315-23.
29. Oertelt S, Lian ZX, Cheng CM, et al. Anti-mitochondrial antibodies and primary biliary cirrhosis in TGF-beta receptor II dominant-negative mice. *J Immunol* 2006;177:1655-60.
30. Wakabayashi K, Lian ZX, Moritoki Y, et al. IL-2 receptor alpha(-/-) mice and the development of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2006;44:1240-9.
31. Salas JT, Banales JM, Sarvide S, et al. Ae2a,b-deficient mice develop antimitochondrial antibodies and other features resembling primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 2008;134:1482-93.

32. Chuang YH, Ridgway WM, Ueno Y, Gershwin ME. Animal models of primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis* 2008;12:333-47.
33. Stefanski HE, Mayerova D, Jameson SC, Hogquist KA. A low affinity TCR ligand restores positive selection of CD8+ T cells in vivo. *J Immunol* 2001;166:6602-7.
34. McGargill MA, Mayerova D, Stefanski HE, et al. A spontaneous CD8 T cell-dependent autoimmune disease to an antigen expressed under the human keratin 14 promoter. *J Immunol* 2002;169:2141-7.
35. Mayerova D, Parke EA, Bursch LS, Odumade OA, Hogquist KA. Langerhans cells activate naive self-antigen-specific CD8 T cells in the steady state. *Immunity* 2004;21:391-400.
36. O'Mahony CA, Vierling JM. Etiopathogenesis of primary sclerosing cholangitis. *Semin Liver Dis* 2006;26:3-21.
37. Vierling JM. Animal models for primary sclerosing cholangitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2001;15:591-610.
38. Numata Y, Tazuma S, Nishioka T, Ueno Y, Chayama K. Immune response in mouse experimental cholangitis associated with colitis induced by dextran sulfate sodium. *J Gastroenterol Hepatol* 2004;19:910-5.
39. Numata Y, Tazuma S, Ueno Y, Nishioka T, Hyogo H, Chayama K. Therapeutic effect of repeated natural killer T cell stimulation in mouse cholangitis complicated by colitis. *Dig Dis Sci* 2005;50:1844-51.
40. Fickert P, Fuchsbichler A, Wagner M, et al. Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. *Gastroenterology* 2004;127:261-74.
41. Fickert P, Wagner M, Marschall HU, et al. 24-norUrsodeoxycholic acid is superior to ursodeoxycholic acid in the treatment of sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. *Gastroenterology* 2006;130:465-81.
42. Popov Y, Patsenker E, Fickert P, Trauner M, Schuppan D. Mdr2 (Abcb4)^{-/-} mice spontaneously develop severe biliary fibrosis via massive dysregulation of pro- and antifibrogenic genes. *J Hepatol* 2005;43:1045-54.
43. Fickert P, Stoger U, Fuchsbichler A, et al. A new xenobiotic-induced mouse model of sclerosing cholangitis and biliary fibrosis. *Am J Pathol* 2007;171:525-36.
44. Beissert S, Schwarz A, Schwarz T. Regulatory T cells. *J Invest Dermatol* 2006;126:15-24.
45. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151-64.
46. Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol* 2001;167:1137-40.
47. Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med* 1996;184:387-96.

48. Levings MK, Allan S, d'Hennezel E, Piccirillo CA. Functional dynamics of naturally occurring regulatory T cells in health and autoimmunity. *Adv Immunol* 2006;92:119-55.
49. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004;22:531-62.
50. Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, Barbosa TC, Cumano A, Bandeira A. CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol* 2001;166:3008-18.
51. Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 2000;192:295-302.
52. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 2000;12:431-40.
53. Bruder D, Probst-Kepper M, Westendorf AM, et al. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2004;34:623-30.
54. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, et al. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002;16:311-23.
55. Iellem A, Mariani M, Lang R, et al. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 2001;194:847-53.
56. Huang CT, Workman CJ, Flies D, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 2004;21:503-13.
57. Lehmann J, Huehn J, de la RM, et al. Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:13031-6.
58. Read S, Mauze S, Asseman C, Bean A, Coffman R, Powrie F. CD38+ CD45RB(low) CD4+ T cells: a population of T cells with immune regulatory activities in vitro. *Eur J Immunol* 1998;28:3435-47.
59. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330-6.
60. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057-61.
61. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 2005;22:329-41.
62. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001;27:20-1.

63. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 2001;27:68-73.
64. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151-64.
65. Fontenot JD, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J Exp Med* 2005;202:901-6.
66. Tuovinen H, Laurinolli TT, Rossi LH, Pekkarinen PT, Mattila I, Arstila TP. Thymic production of human FOXP3(+) regulatory T cells is stable but does not correlate with peripheral FOXP3 expression. *Immunol Lett* 2008;117:146-53.
67. Bensinger SJ, Bandeira A, Jordan MS, Caton AJ, Laufer TM. Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)25(+) immunoregulatory T cells. *J Exp Med* 2001;194:427-38.
68. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, et al. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2001;2:301-6.
69. Liston A, Nutsch KM, Farr AG, et al. Differentiation of regulatory Foxp3+ T cells in the thymic cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:11903-8.
70. van Santen HM, Benoist C, Mathis D. Number of T reg cells that differentiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells. *J Exp Med* 2004;200:1221-30.
71. Siewert C, Lauer U, Cording S, et al. Experience-driven development: effector/memory-like alphaE+Foxp3+ regulatory T cells originate from both naive T cells and naturally occurring naive-like regulatory T cells. *J Immunol* 2008;180:146-55.
72. Jaeckel E, Kretschmer K, Apostolou I, von BH. Instruction of Treg commitment in peripheral T cells is suited to reverse autoimmunity. *Semin Immunol* 2006;18:89-92.
73. Luth S, Huber S, Schramm C, et al. Ectopic expression of neural autoantigen in mouse liver suppresses experimental autoimmune neuroinflammation by inducing antigen-specific Tregs. *J Clin Invest* 2008;118:3403-10.
74. Horwitz DA, Zheng SG, Gray JD. Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)CD4(+) CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends Immunol* 2008;29:429-35.
75. Chen W, Jin W, Hardegen N, et al. Conversion of peripheral CD4+. *J Exp Med* 2003;198:1875-86.
76. Schramm C, Huber S, Protschka M, et al. TGFbeta regulates the CD4+CD25+ T-cell pool and the expression of Foxp3 in vivo. *Int Immunol* 2004;16:1241-9.
77. Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+. *J Immunol* 2004;172:5149-53.

78. Josefowicz SZ, Rudensky A. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity* 2009;30:616-25.
79. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441:235-8.
80. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006;24:179-89.
81. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat. *Nat Immunol* 2008;9:641-9.
82. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?. *Immunity* 2009;30:626-35.
83. Davidson TS, DiPaolo RJ, Andersson J, Shevach EM. Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 2007;178:4022-6.
84. Mucida D, Park Y, Kim G, et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 2007;317:256-60.
85. Selvaraj RK, Geiger TL. A kinetic and dynamic analysis of Foxp3 induced in T cells by TGF-beta. *J Immunol* 2007;178:7667-77.
86. Floess S, Freyer J, Siewert C, et al. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol* 2007;5:e38.
87. Selvaraj RK, Geiger TL. A kinetic and dynamic analysis of Foxp3 induced in T cells by TGF-beta. *J Immunol* 2007;179:11.
88. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002;16:6-21.
89. Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, et al. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol* 2008;38:1654-63.
90. Piccirillo CA, Thornton AM. Cornerstone of peripheral tolerance: naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *Trends Immunol* 2004;25:374-80.
91. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008;133:775-87.
92. Bopp T, Becker C, Klein M, et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* 2007;204:1303-10.
93. Huber S, Schramm C, Lehr HA, et al. Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. *J Immunol* 2004;173:6526-31.
94. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 2001;194:629-44.

95. Esparza EM, Arch RH. Signaling triggered by glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related gene: regulation at the interface between regulatory T cells and immune effector cells. *Front Biosci* 2006;11:1448-65.
96. Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol* 2001;167:1137-40.
97. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998;188:287-96.
98. Lin CY, Tsai MC, Huang CT, et al. Liver injury is associated with enhanced regulatory T-cell activity in patients with chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2007;14:503-11.
99. Xu D, Fu J, Jin L, et al. Circulating and liver resident CD4+CD25+ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B. *J Immunol* 2006;177:739-47.
100. Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C, et al. T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005;79:7860-7.
101. Rushbrook SM, Ward SM, Unitt E, et al. Regulatory T cells suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during persistent hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005;79:7852-9.
102. Ward SM, Fox BC, Brown PJ, et al. Quantification and localisation of FOXP3+ T lymphocytes and relation to hepatic inflammation during chronic HCV infection. *J Hepatol* 2007;47:316-24.
103. Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2005;65:2457-64.
104. Unitt E, Rushbrook SM, Marshall A, et al. Compromised lymphocytes infiltrate hepatocellular carcinoma: the role of T-regulatory cells 2. *Hepatology* 2005;41:722-30.
105. Cao M, Cabrera R, Xu Y, et al. Hepatocellular carcinoma cell supernatants increase expansion and function of CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells. *Lab Invest* 2007;87:582-90.
106. Demirkiran A, Baan CC, Kok A, Metselaar HJ, Tilanus HW, van der Laan LJ. Intrahepatic detection of FOXP3 gene expression after liver transplantation using minimally invasive aspiration biopsy. *Transplantation* 2007;83:819-23.
107. Wei HX, Chuang YH, Li B, et al. CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells protect against T cell-mediated fulminant hepatitis in a TGF-beta-dependent manner in mice. *J Immunol* 2008;181:7221-9.
108. Ma X, Hua J, Mohamood AR, Hamad AR, Ravi R, Li Z. A high-fat diet and regulatory T cells influence susceptibility to endotoxin-induced liver injury. *Hepatology* 2007;46:1519-29.

109. Sasaki M, Ikeda H, Sawada S, Sato Y, Nakanuma Y. Naturally-occurring regulatory T cells are increased in inflamed portal tracts with cholangiopathy in primary biliary cirrhosis. *J Clin Pathol* 2007;60:1102-7.
110. Lan RY, Cheng C, Lian ZX, et al. Liver-targeted and peripheral blood alterations of regulatory T cells in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2006;43:729-37.
111. Liu B, Shi XH, Zhang FC, Zhang W, Gao LX. Antimitochondrial antibody-negative primary biliary cirrhosis: a subset of primary biliary cirrhosis. *Liver Int* 2008;28:233-9.
112. Aoki CA, Roifman CM, Lian ZX, et al. IL-2 receptor alpha deficiency and features of primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 2006;27:50-3.
113. Longhi MS, Ma Y, Bogdanos DP, Cheeseman P, Mieli-Vergani G, Vergani D. Impairment of CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells in autoimmune liver disease. *J Hepatol* 2004;41:31-7.
114. Longhi MS, Ma Y, Mitry RR, et al. Effect of CD4+ CD25+ regulatory T-cells on CD8 T-cell function in patients with autoimmune hepatitis. *J Autoimmun* 2005;25:63-71.
115. Longhi MS, Hussain MJ, Mitry RR, et al. Functional study of CD4+CD25+ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis. *J Immunol* 2006;176:4484-91.
116. Longhi MS, Meda F, Wang P, et al. Expansion and de novo generation of potentially therapeutic regulatory T cells in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2008;47:581-91.
117. June CH, Blazar BR. Clinical application of expanded CD4+25+ cells. *Semin Immunol* 2006;18:78-88.
118. Szanya V, Ermann J, Taylor C, Holness C, Fathman CG. The subpopulation of CD4+CD25+ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7. *J Immunol* 2002;169:2461-5.
119. Tarbell KV, Petit L, Zuo X, et al. Dendritic cell-expanded, islet-specific CD4+CD25+ CD62L+ regulatory T cells restore normoglycemia in diabetic NOD mice. *J Exp Med* 2007;204:191-201.
120. Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo MG. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood* 2005;105:4743-8.
121. Battaglia M, Stabilini A, Migliavacca B, Horejs-Hoeck J, Kaupper T, Roncarolo MG. Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Immunol* 2006;177:8338-47.
122. Polansky JK, Huehn J. [To be or not to be a Treg: epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells]. *Z Rheumatol* 2007;66:417-20.
123. Fantini MC, Becker C, Tubbe I, et al. Transforming growth factor beta induced FoxP3+ regulatory T cells suppress Th1 mediated experimental colitis. *Gut* 2006;55:671-80.

124. Sehrawat S, Suvas S, Sarangi PP, Suryawanshi A, Rouse BT. In vitro-generated antigen-specific CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells control the severity of herpes simplex virus-induced ocular immunoinflammatory lesions. *J Virol* 2008;82:6838-51.
125. Huter EN, Punkosdy GA, Glass DD, Cheng LI, Ward JM, Shevach EM. TGF-beta-induced Foxp3⁺ regulatory T cells rescue scurfy mice. *Eur J Immunol* 2008;38:1814-21.
126. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22:696-9.
127. Vassar R, Rosenberg M, Ross S, Tyner A, Fuchs E. Tissue-specific and differentiation-specific expression of a human K14 keratin gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:1563-7.
128. Lapierre P, Beland K, Martin C, Alvarez F, Jr., Alvarez F. Forkhead box p3⁺ regulatory T cell underlies male resistance to experimental type 2 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2010;51:1789-98.
129. Presser K, Schwinge D, Wegmann M, et al. Coexpression of TGF-beta1 and IL-10 enables regulatory T cells to completely suppress airway hyperreactivity. *J Immunol* 2008;181:7751-8.
130. Mucida D, Pino-Lagos K, Kim G, et al. Retinoic acid can directly promote TGF-beta-mediated Foxp3(+) Treg cell conversion of naive T cells. *Immunity* 2009;30:471-2.
131. Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo MG. Rapamycin selectively expands CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells. *Blood* 2005;105:4743-8.
132. Battaglia M, Stabilini A, Migliavacca B, Horejs-Hoeck J, Kaupper T, Roncarolo MG. Rapamycin promotes expansion of functional CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Immunol* 2006;177:8338-47.
133. Strauss L, Whiteside TL, Knights A, Bergmann C, Knuth A, Zippelius A. Selective survival of naturally occurring human CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells cultured with rapamycin. *J Immunol* 2007;178:320-9.
134. Long SA, Buckner JH. Combination of rapamycin and IL-2 increases de novo induction of human CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) T cells. *J Autoimmun* 2008;30:293-302.
135. Lan RY, Cheng C, Lian ZX, et al. Liver-targeted and peripheral blood alterations of regulatory T cells in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2006;43:729-37.
136. Gleicher N, Barad DH. Gender as risk factor for autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2007;28:1-6.
137. Gonzalez DA, Diaz BB, Rodriguez Perez MC, Hernandez AG, Chico BN, de Leon AC. Sex hormones and autoimmunity. *Immunol Lett* 2010;133:6-13.
138. Giron-Gonzalez JA, Moral FJ, Elvira J, et al. Consistent production of a higher TH1:TH2 cytokine ratio by stimulated T cells in men compared with women. *Eur J Endocrinol* 2000;143:31-6.

139. Cutolo M, Sulli A, Serio B, Accardo S, Masi AT. Estrogens, the immune response and autoimmunity. *Clin Exp Rheumatol* 1995;13:217-26.
140. Ferguson MM, McDonald FG. Oestrogen as an inhibitor of human NK cell cytotoxicity. *FEBS Lett* 1985;191:145-8.
141. Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2006;177:566-73.
142. Begolka WS, Miller SD. Cytokines as intrinsic and exogenous regulators of pathogenesis in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Res Immunol* 1998;149:771-81.
143. Willenborg DO, Fordham SA, Staykova MA, Ramshaw IA, Cowden WB. IFN-gamma is critical to the control of murine autoimmune encephalomyelitis and regulates both in the periphery and in the target tissue: a possible role for nitric oxide. *J Immunol* 1999;163:5278-86.
144. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 2007;25:821-52.
145. Yen D, Cheung J, Scheerens H, et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 2006;116:1310-6.
146. Lan RY, Salunga TL, Tsuneyama K, et al. Hepatic IL-17 responses in human and murine primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 2009;32:43-51.
147. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009;27:485-517.
148. Oertelt S, Rieger R, Selmi C, et al. A sensitive bead assay for antimitochondrial antibodies: Chipping away at AMA-negative primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2007;45:659-65.
149. van Nieuwerk CM, Groen AK, Ottenhoff R, et al. The role of bile salt composition in liver pathology of *mdr2* (-/-) mice: differences between males and females. *J Hepatol* 1997;26:138-45.
150. Baldo P, Cecco S, Giacomini E, Lazzarini R, Ros B, Marastoni S. mTOR pathway and mTOR inhibitors as agents for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2008;8:647-65.
151. Patel SJ, Elliott EN, Knight RJ, Gaber LW, Gaber AO. Considerations in sirolimus use in the early and late post-transplant periods. *Expert Opin Drug Saf* 2009;8:421-34.
152. Gao W, Lu Y, El EB, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB. Contrasting effects of cyclosporine and rapamycin in de novo generation of alloantigen-specific regulatory T cells. *Am J Transplant* 2007;7:1722-32.
153. Sehgal SN. Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin Biochem* 1998;31:335-40.

154. Hendrikx TK, Velthuis JH, Klepper M, et al. Monotherapy rapamycin allows an increase of CD4 CD25 FoxP3 T cells in renal recipients. *Transpl Int* 2009;22:884-91.
155. Luth S, Huber S, Schramm C, et al. Ectopic expression of neural autoantigen in mouse liver suppresses experimental autoimmune neuroinflammation by inducing antigen-specific Tregs. *J Clin Invest* 2008;118:3403-10.
156. Jaeckel E, von BH, Manns MP. Antigen-specific FoxP3-transduced T-cells can control established type 1 diabetes. *Diabetes* 2005;54:306-10.
157. Wei S, Kryczek I, Zou W. Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking. *Blood* 2006;108:426-31.
158. Berlin C, Bargatze RF, Campbell JJ, et al. alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* 1995;80:413-22.
159. Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, Kagechika H, Kato C, Song SY. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* 2004;21:527-38.
160. Xu L, Kitani A, Fuss I, Strober W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol* 2007;178:6725-9.
161. Osorio F, LeibundGut-Landmann S, Lochner M, et al. DC activated via dectin-1 convert Treg into IL-17 producers. *Eur J Immunol* 2008;38:3274-81.
162. Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, et al. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* 2008;29:44-56.
163. Horwitz DA. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus: past, present and future. *Arthritis Res Ther* 2008;10:227.
164. Godebu E, Summers-Torres D, Lin MM, Baaten BJ, Bradley LM. Polyclonal adaptive regulatory CD4 cells that can reverse type I diabetes become oligoclonal long-term protective memory cells. *J Immunol* 2008;181:1798-805.
165. Selvaraj RK, Geiger TL. Mitigation of experimental allergic encephalomyelitis by TGF-beta induced Foxp3+ regulatory T lymphocytes through the induction of anergy and infectious tolerance. *J Immunol* 2008;180:2830-8.
166. Aricha R, Feferman T, Fuchs S, Souroujon MC. Ex vivo generated regulatory T cells modulate experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Immunol* 2008;180:2132-9.
167. Lal G, Bromberg JS. Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood* 2009;114:3727-35.
168. Creusot F, Acs G, Christman JK. Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. *J Biol Chem* 1982;257:2041-8.
169. Erhardt A, Biburger M, Papadopoulos T, Tiegs G. IL-10, regulatory T cells, and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver injury in mice. *Hepatology* 2007;45:475-85.

170. Huber S, Schramm C, Lehr HA, et al. Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. *J Immunol* 2004;173:6526-31.

8. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ABTS	Diammonium-2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure
ACK	Ammonium- Chlorid-Lyse Puffer
AHR	Atemwegshyperreaktivität
AIH	Autoimmune Hepatitis
AK	Antikörper
ALT	Alanin-Aminotransferase
AMA	Anti-mitochondriale Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
Anti-LP	Leber Pankreas Antigen
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
AST	Aspartat-Aminotransferase
Aza	Azathymidine
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw	beziehungsweise
CD	Cluster of differentiation
CFSE	Carboxyluorescein succinimidyl ester
CIA	Kollagen induzierte Arthritis
ConA	Concanavalin A
CTLA 4	Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4
DDC	1,4- Dihydro-2,4,6-trimethylpyridin-3,5-dicarbonsäurediethylester 99%
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSS	Dextran sulfate sodium
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Foxp3	Forhead Box Protein 3
GFP	Green Fluorescent Protein
GITR	Glucocorticoid-induced TNFR-related protein
h	Stunde
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HLA	Human Leukocyte Antigen
i.p.	Intraperitoneal
IBD	Inflammatory Bowel Disease
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPEX-Syndrom	Immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked Syndrom
iTreg	Induzierte regulatorische T Zellen
kg	Kilogramm
KGW	Kilogramm Körpergewicht
LAG-3	Lymphocyte Activation Gen-3

LKM	Leber und nieren Mikrosome
M	Molar
MACS	Magnet Activated Cell Sorting
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NOD	Non-obese diabetic
Nrp-1	Neuropilin-1
nTreg	Natürliche regulatorische T Zellen
OVA	Ovalbumin
PBC	Primär biliäre Zirrhose
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDC	Pyruvate Dehydrogenase Komplex
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
RA	Retinoic Acid
RA	Rheumatoide Arthritis
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.c.	Subcutan
sec	Sekunde
sf	scurfy
SLE	Systemischer Lupus Erythematosus
t	Zeit
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TGF	Transforming Growth Factor
TH	T Helfer
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Treg	regulatorische T Zelle
U	Units
VCAM	Vascular cell adhesion protein
WT	Wildtyp

9. Kongressbeiträge

EASL Monothematic Conference Immune Mediated Liver Injury, Hamburg 2008

Foxp3+ T cells in liver and draining lymph nodes of patients with autoimmune liver disease

Dorothee Schwinge, Frederiecke Wortmann, Alexander Quaas, Björn Franke, Ansgar W. Lohse, Christoph Schramm

27.Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL), Bonn 2010

Geschlechtsabhängiges, induzierbares Mausmodell der Primär Biliären Zirrhose (PBC)

Dorothee Schwinge, Alexander Quaas, Moritz Peiseler, Antonella Carambia, Tanja Trautmann, Ansgar W. Lohse, Christoph Schramm

Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGMI), Wiesbaden 2010

Geschlechtsabhängiges, induzierbares Mausmodell der Primär Biliären Zirrhose (PBC)

Dorothee Schwinge, Alexander Quaas, Moritz Peiseler, Antonella Carambia, Tanja Trautmann, Ansgar W. Lohse, Christoph Schramm

The International Liver Congress 2010 by the European Association for the Study of the Liver (EASL), Wien 2010

Gender effects in a novel inducible mouse model of Primary Biliary Cirrhosis (PBC)

Dorothee Schwinge, Antonella Carambia, Alexander Quaas, Tanja Trautmann, Johannes Herkel, Ansgar W. Lohse, Christoph Schramm

10. Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Lohse möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, dass ich die vorliegende Doktorarbeit in seinem Labor anfertigen durfte.

Bei Herrn Prof. Dr. Thomas Dobner für die Begutachtung meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Christoph Schramm für die außerordentlich gute Betreuung meiner Doktorarbeit. Für die Möglichkeit selbständig zu arbeiten und vor allem für die Geduld, wenn es mal nicht so gut lief. Auch die gemeinsame Begeisterung bei guten Ergebnissen und die Diskussionen rund um mein Projekt haben mich immer motiviert und vorangebracht.

Ebenso möchte mich bei Herrn PD Dr. Johannes Herkel bedanken. Für die stets offene Tür, um mit Fragen und Problemen zu kommen und für das Verständnis, die Aufmunterung und die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Bei Antonella Carambia, die mir eine sehr gute Freundin geworden ist und mit der ich von Anfang an eine tolle Zeit hatte. Bei Denise Heim und Tanja Trautmann für ihre Freundschaft und die schöne gemeinsame Zeit.

Bei unseren technischen Assistenten. Vor allem bei Agnes Malotta, die meine Versuche so schnell bearbeitet hat, dass ich mit der Auswertung fast nicht hinterher kam. Bei Marko Hilken, der stets die volle Kontrolle über das Labor hat und bei Helga Reschke.

Bei allen Mitarbeitern im Labor für die tolle Arbeitsatmosphäre. Gruppenübergreifend hat es einfach Spass gemacht in unserem Labor zu arbeiten. Grillfeiern oder gelegentliche abendliche Treffen im Kaffeeraum, sowie ein unvergesslicher Abend im „Dschungel“, bleiben in sehr guter Erinnerung.

All meinen Freunden außerhalb des Labors, die mich schon während des Studiums und der Diplomarbeit unterstützt haben und die auch bei meiner Doktorarbeit, trotz der trennenden Kilometer, immer für mich da waren. Dabei besonders Carolin Grüttner, Ayse Kilic, Nadine Biedenkopf, Katrin Presser, Björn Hacker, Dirk und Kerstin Buschmann, Anika Schmitt und Gerhard Blümlein.

Meinen Eltern Herbert und Gerlinde Schwinge möchte ich von ganzem Herzen für Ihre Liebe und Ihre Unterstützung in allen Lebensbelangen danken.

Meiner Oma Erika, meiner Schwester Konstanze und Jörg, allen Bönstädtern, Friedbergern, Felsbergern, Vasbeckern und Vilbelern für ihre Unterstützung auf unterschiedliche Art und Weise. Und Trixi unserem Hund, denn bei gemeinsamen Spaziergängen kamen mir meist die besten Ideen.