

Charakterisierung immunregulatorischer Mechanismen von Interleukin-10 bei Leberentzündungen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturae -Doktor der Naturwissenschaften

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

vorgelegt von
Jessica Rauch
aus Hamburg

Hamburg, Dezember 2014

Gutachter

- 1. PD Dr. Johannes Herkel**
I. Medizinische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

- 2. Prof. Dr. Susanne Dobler**
Zoologisches Institut an der Universität Hamburg

Tag der Disputation: 19.02.2015

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Immunregulation in der Leber	1
1.1.1 Toleranzinduktion in der Leber	1
1.1.2 Entzündungen in der Leber	2
1.2 Rekrutierung von T-Zellen in die Leber	3
1.2.1 Das Multi-Step Modell der transendothelialen Migration	3
1.2.2 Inflammatorische Chemokine in der Leber	4
1.3 Intrahepatische CD4⁺ T-Zellen	5
1.3.1 T _H 1 Zellen	5
1.3.2 T _H 17 Zellen	6
1.4 Regulation von Entzündungen	8
1.4.1 Periphere Regulationsmechanismen und IL-10	8
1.4.2 Regulation von Leberentzündungen durch IL-10	9
1.5 Autoimmune Lebererkrankungen	10
1.5.1 Ein Überblick	10
1.5.2 Autoimmune Hepatitis	11
1.6 Entwicklung des verwendeten Mausmodells	12
1.7 Zielsetzung	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Geräte	15
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	15
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	16
2.1.4 Puffer, Lösungen und Medien	17
2.1.5 Kits	18
2.1.6 Antikörper und Proteine	18
2.1.7 Primersonden für die quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion	19
2.1.8 verwendete Software	20
2.2 Versuchstiere und ihre Behandlung	20
2.2.1 Induktion einer Hepatitis	20
2.2.2 Immunisierungen zur Analyse der Initiation der Immunantwort im Lymphknoten	21
2.3 Isolation primärer Zellen	21
2.3.1 Isolation mononukleärer Zellen aus der Leber	21

2.3.2	Isolation von CD11c ⁺ Dendritischer Zellen aus der Milz	22
2.3.3	Isolation mononukleärer Zellen aus den poplitealen Lymphknoten	22
2.3.4	Isolation von CD4 ⁺ T-Zellen aus der Leber und den poplitealen Lymphknoten	22
2.4	Zellbiologische Methoden	23
2.4.1	Zellzahlbestimmung	23
2.4.2	Restimulation von Zellen für die Detektion von Zytokinen im Zellkulturüberstand	23
2.4.3	Restimulation von Zellen für die intrazelluläre Färbung von Zytokinen	24
2.5	Zytokinbestimmung im Zellkulturüberstand	24
2.6	Durchflusszytometrische Analysen	24
2.6.1	Vitalitätstest	24
2.6.2	Färbung von Oberflächenmarkern	25
2.6.3	Intrazelluläre Färbungen	25
2.6.4	Durchflusszytometrie	25
2.7	Molekularbiologische Methoden	26
2.7.1	RNA-Isolation aus Lebergewebe	26
2.7.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	26
2.7.3	cDNA-Synthese	26
2.7.4	Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion	27
2.8	Histologie	28
2.8.1	Präparation der Leber	28
2.8.2	Hämatoxilin-Eosin (HE) Färbung	29
2.8.3	Modifizierter histologischer Aktivitätsindex (mHAI)	29
2.9	Statistische Auswertung	29
3.	Ergebnisse	30
3.1	Charakterisierung des Einflusses von IL-10 bei Leberentzündungen	30
3.1.1	Induktion einer Leberentzündung in Abwesenheit von IL-10	30
3.1.2	Zusammensetzung der intrahepatischen Zellinfiltrate in IL-10-defizienten Mäusen	34
3.1.3	Verstärkte hepatische Rekrutierung von T-Zellen in IL-10-defizienten Mäusen	36
3.1.4	Funktionelle Charakterisierung leberinfiltrierender T-Zellen	38
3.1.5	Verstärkte T-Zell-Effektorantworten in den Lebern IL-10 defizienter Mäuse	39
3.1.6	Erhöhtes T _H 17 förderndes Milieu in den Lebern von IL-10 defizienten Mäusen	42
3.1.7	Verstärkte Aktivierung intrahepatischer CD4 ⁺ T-Zellen durch erhöhte Expression von MHCII und kostimulatorischen Molekülen bei IL-10-Defizienz	43
3.2	Charakterisierung des Einflusses von IL-10 bei der T-Zelldifferenzierung	45
3.2.1	Veränderte zelluläre Zusammensetzung im Lymphknoten bei IL-10 Defizienz	46
3.2.2	Verstärkte Differenzierung zu T _H 1 und T _H 17 Zellen in IL-10 defizienten Mäusen	47
3.3	Charakterisierung des Einflusses von IL-10 im CD4dnIL-10Rα-Mausmodell	50

3.3.1	Induktion einer Leberentzündung in CD4dnIL-10R α Mäusen	51
3.3.2	Erhöhte CD4 ⁺ T-Zellzahlen in den Lebern immunisierter CD4dnIL-10R α Mäuse	53
3.3.3	Vermehrte IFN γ , IL-17 und GM-CSF Ausschüttung durch T-Zellen in den Lebern von CD4dnIL-10R α Mäuse im Vergleich mit C57Bl/6 Mäusen	55
3.3.4	Die verstärkte Aktivierung von T-Zellen in CD4dnIL-10R α Mäuse korreliert nicht mit einer erhöhten Expressionen von MHCII und kostimulatorischen Molekülen	56
3.4	Charakterisierung des Einflusses der IL-10 Signalgebung auf T-Zellen bei der T-Zelldifferenzierung	58
3.4.1	Gleiche T-Zellzusammensetzung in den Lymphknoten der CD4dnIL10R α und Wildtyp C57Bl/6 Mäuse	58
3.4.2	Erhöhte T _H 1 und T _H 17 Differenzierung im Vergleich zum Wildtyp C57Bl/6, vermindert im Vergleich zu IL-10 defizienten Mäusen	59
4.	Diskussion	63
4.1	IL-10 nimmt eine bedeutende regulatorische Funktion bei der induzierten Hepatitis im Mausmodell ein	63
4.2	Untersuchungen zum Wirkmechanismus von IL-10	66
4.2.1	IL-10 reguliert bereits die frühe T-Zellaktivierung und –differenzierung zu T _H 1 und T _H 17 Zellen	66
4.2.2	IL-10 inhibiert die Migration und Akkumulation proinflammatorischer T-Zellen in der Leber	69
4.2.3	IL-10 reguliert das intrahepatische Zytokinmilieu, wodurch intrahepatische T _H 1 und T _H 17 Antworten inhibiert werden können	74
4.2.4	Rolle von IL-10, T _H 1 und T _H 17 Zellen bei der Ausbildung autoimmuner Pathologien	77
4.3	Ausblick	80
5.	Zusammenfassung	83
6.	Abstract	86
7.	Anhang	88
7.1	Literaturverzeichnis	88
7.2	Abkürzungsverzeichnis	119
7.3	Kongressbeiträge	123
7.4	Danksagung	124
7.5	Eidesstattliche Erklärung	126

1. Einleitung

1.1 Immunregulation in der Leber

Die Leber ist neben ihren Funktionen als Stoffwechsel- und Entgiftungsorgan auch an der peripheren Immunregulation beteiligt. Sie ist über die Leberarterie mit der systemischen Zirkulation und über die Pfortader mit dem Gastrointestinaltrakt verbunden, wodurch sie kontinuierlich mit Nahrungsmittelantigenen, mikrobiellen Bestandteilen der Darmflora wie z.B. Lipopolysaccharide (LPS), aber auch mit potentiell schädlichen Pathogenen in Kontakt kommt^{1,2}. Die Leber enthält eine Vielzahl von Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems wie leberresidierende Makrophagen (KCs, *kupffer cells*), Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Natürliche Killer-T-Zellen (NKT Zellen) sowie B- und T-Zellen^{3,4}. Immunzellen, die in der Leber residieren oder durch die Leber zirkulieren, haben das Potential (a) immunologische Toleranz gegen harmlose Antigene zu induzieren und so die Homöostase in der Leber zu bewahren oder (b) effektive Immunantworten gegen Pathogene zu initiieren⁵.

1.1.1 Toleranzinduktion in der Leber

Nicht-parenchymale Zellen in der Leber wie Dendritische Zellen (DCs, *dendritic cells*) sinusoidale Endothelzellen (LSECs, *Liver Sinusoidal Endothelial Cells*) und KCs scheinen für die tolerogenen Eigenschaften der Leber verantwortlich zu sein^{6,7}. Diese Zellen können Immunantworten beispielsweise durch die Expression von PD-L1, einem negativen Kostimulator der T-Zellaktivierung, und der Produktion antiinflammatorischer Zytokine wie TGF β und Interleukin-10 (IL, Interleukin) supprimieren⁸. Einzigartig in der Leber ist zudem, dass nicht nur professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC, *Antigen Presenting Cell*) wie DCs und KCs zur Antigenpräsentation fähig sind, sondern auch LSECs und Hepatozyten^{2,4,9}. T-Zellen erkennen ihre Antigene in Form prozessierter Peptide, die über Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, *Major Histocompatibility Complex*) präsentiert werden¹⁰. Der MHC I/Antigen-Komplex wird von CD8⁺ T-Zellen erkannt, der MHCII/Antigen-Komplex hingegen von CD4⁺ T-Zellen¹¹. Die Interaktion zwischen MHC/Antigen-Komplex und dem T-Zellrezeptor (TCR, *T Cell Receptor*) stellt das erste Signal bei der Aktivierung von T-Zellen dar. Zur vollständigen Aktivierung werden weitere kostimulatorische Signale der CD28/B7-Familie benötigt^{12,13}. Hierzu gehören CD80 und CD86, die von APCs exprimiert werden und mit CD28 auf der Oberfläche von T-Zellen interagieren. Unter physiologischen Bedingungen ist die Expression der MHC-Moleküle und kostimulatorischen Moleküle wie CD80 und CD86 in der Leber gering¹⁴. So exprimieren beispielsweise DCs aus der Leber wenig MHCII und CD80/CD86 und scheinen einen „unreifen“ Phänotyp aufzuweisen^{2,4,9}. Hepatozyten exprimieren wenig MHCI Moleküle und

unter physiologischen Bedingungen keine MHCII Moleküle¹⁵. Auch KCs sind durch die geringe Expression von MHC-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen charakterisiert¹⁶. Physiologische Konzentrationen von Endotoxinen wie LPS scheinen die Sekretion von IL-10 durch LSECs und KCs zu induzieren und auch die antigenpräsentierenden Eigenschaften von LSECs zu reduzieren, indem die Expression von MHCII, CD80 und CD86 auf LSECs vermindert wird^{2,17,18}. Normalerweise führt die Aktivierung naiver T-Zellen in der Leber zur Induktion von Toleranz statt zur Herausbildung von effektiven inflammatorischen Immunantworten¹⁹. Nach Aktivierung durch Leber-APCs differenzieren CD4⁺ T-Zellen anstatt zu proinflammatorischen T_H1 oder T_H17 Zellen eher zu T_H2 Zellen, die humorale Immunantworten induzieren und u.a. die antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 sezernieren, oder zu regulatorischen T-Zellen, die Immunantworten supprimieren können^{15,20-24}. Dies scheint durch das tolerogene Zytokinmilieu in der Leber bedingt zu sein. Die primäre Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen in der Leber scheint hingegen zur Deletion der T-Zellen oder zur Induktion von Anergie zu führen^{19,25-27}.

Diese Mechanismen scheinen kollektiv zu wirken und ein immuntolerantes Milieu in der Leber zu schaffen. Sie scheinen essentiell für die normale Immunhomöostase in der Leber zu sein, die kontinuierlich mit nicht-infektiösen Antigenen in Kontakt kommt. Allerdings müssen in der Leber auch effektive Immunantworten gegen Pathogene erfolgen, um Gewebeschädigungen zu vermeiden.

1.1.2 Entzündungen in der Leber

Kommt es zur Leberschädigung, die beispielsweise durch Pathogene wie Hepatitisviren oder Bakterien verursacht wird, dient die Ausbildung einer Entzündungsreaktion der Beseitigung von infizierten und geschädigten Zellen²⁸. Hierbei steigt sowohl die lokale Konzentration proinflammatorischer Moleküle als auch die Expression von MHC-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen stark an. KCs exprimieren beispielsweise sogenannte PRR (PRR, *Pattern Recognition Receptors*) über die sie konservierte Strukturen von Pathogenen (PAMP, *Pathogen-Associated Microbial Patterns*) erkennen und internalisieren können²⁹. Hierdurch können KCs aktiviert werden und proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF α ausschütten, die die Infiltration von Neutrophilen Granulozyten (Neutrophile) zum Entzündungsort steigern^{8,30}. Außerdem können Hepatozyten unter inflammatorischen Bedingungen neben CD80 und CD86 zudem MHCII exprimieren und hierdurch Antigene gegenüber CD4⁺ T-Zellen präsentieren^{31,32}. Auch DCs exprimieren PRR und können beispielsweise durch LPS aktiviert werden, wodurch sie heranreifen, die Expression von MHC-Molekülen sowie kostimulatorischen Molekülen (CD80/CD86) hochregulieren und proinflammatorische Zytokine wie IFN γ , TNF α und IL-12 sezernieren³³⁻³⁹. Während LSECs, Hepatozyten und KCs die Leber nicht verlassen, können DCs, die Antigene in der Leber

aufgenommen haben, in die sekundären bzw. peripheren lymphatischen Organe wie Milz und Lymphknoten migrieren und dort Antigene gegenüber naiven T-Zellen präsentieren^{8,40}. T-Zellen differenzieren im Zuge der primären Stimulation zu unterschiedlichen T-Effektorzellen, die dann im Zuge von Entzündungen zur Leber rekrutiert werden können und hier ihre Effektorfunktionen ausüben. T-Zellen übernehmen wichtige Funktionen bei der Abwehr von Pathogenen, können jedoch auch selbstreaktiv (autoreaktiv) sein und die Entwicklung autoimmuner Pathologien induzieren⁴¹. Sie können zudem zur Leberschädigung beitragen, indem sie entweder direkt zytotoxisch wirken oder proinflammatorische Zytokine ausschütten und hierdurch die Schädigung von Hepatozyten vermitteln⁴². Entzündungsreaktionen werden normalerweise schnell limitiert, um Gewebeschäden zu minimieren und die Immunhomöostase wieder herzustellen. Dysfunktionale oder deregulierte Leberentzündungen können jedoch zu chronischen Lebererkrankungen wie chronischen Hepatitisvirus-Infektionen⁴³ oder autoimmunen Lebererkrankungen führen, zu denen die autoimmune Hepatitis (AIH)⁴⁴, die Primär Biliäre Zirrhose (PBC)⁴⁵ und die Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC)⁴⁶ zählen. Diese können im Endstadium zur Zirrhose, hepatozellulären Karzinomen und Leberversagen führen⁴⁷⁻⁴⁹. Bei chronischen Lebererkrankungen sind T-Zellen, die gegen Antigene in der Leber gerichtet sind, entscheidend an der Pathogenese der Hepatitis beteiligt⁵⁰. Jedoch finden sich nicht ausschließlich Antigen-spezifische T-Zellen in den inflammatorischen Infiltraten. So wurde beispielsweise für virale Hepatitiden beschrieben, dass auch Virus-unspezifische T-Zellen in Form einer sogenannten *Bystander* Hepatitis in der Leber akkumulieren und die Hepatitis weiter verstärken können ohne zur Viruskontrolle beizutragen^{51,52}.

1.2 Rekrutierung von T-Zellen in die Leber

Naive T-Zellen zirkulieren zwischen den sekundären lymphatischen Organen, bis sie durch Antigenpräsentation und gleichzeitige Kostimulation aktiviert werden und zu T-Effektorzellen differenzieren. T-Effektorzellen können dann aus dem Blut in periphere Gewebe und zum Ort der Entzündung einwandern. Die Migration von T-Zellen in Gewebe wird hierbei durch Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren auf T-Zellen und deren Interaktion mit Chemokinliganden und endothelialen Adhäsionsmolekülen ermöglicht^{53,54}.

1.2.1 Das Multi-Step Modell der transendothelialen Migration

Während der Entwicklung hepatischer Entzündungen steigt die Migration von Lymphozyten in die Leber deutlich an und die Art der rekrutierten Zellen wie auch die intrahepatische Lokalisation der infiltrierenden Leukozyten bestimmen letztendlich das Ausmaß der Lebererkrankung⁵⁵. Bei chronischen Hepatitiden werden Leukozyten kontinuierlich in die Leber rekrutiert und die Retention der Leukozyten in der Leber resultiert in fortwährender

Entzündung⁵⁶. Die Einwanderung von T-Zellen und weiterer Leukozyten erfolgt in der Leber im Gegensatz zu anderen Geweben nicht über postkapillare Venolen sondern über die Sinusoide, in denen LSECs eine endotheliale Barriere zwischen dem sinusoidalen Lumen und dem Leberparenchym bilden⁵⁷. Zirkulierende T-Zellen können mit LSECs aufgrund des langsamen Blutflusses und des geringen Durchmessers der Sinusoide im Gegensatz zu anderen Geweben Selektin-unabhängig interagieren⁵⁸⁻⁶². Auf der luminalen Endotheloberfläche binden immobilisierte Chemokine an Chemokinrezeptoren der T-Zellen, wodurch die Aktivierung von Integrinen induziert wird⁶³. Dies führt zur Affinitätssteigerung der Integrine und zur Bindung endothelialer Adhäsionsmoleküle, wodurch die feste Adhäsion der T-Zellen an das Endothel ermöglicht wird⁶⁴⁻⁶⁶. Die chemokinabhängige Aktivierung von Integrinen und deren Bindung an Adhäsionsmoleküle des Endothels stellen somit den ersten Schritt der transendothelialen Migration von T-Zellen in die Leber dar. Im letzten Schritt durchqueren die adhären T-Zellen das Endothel und wandern in das angrenzende Gewebe ein. Im Gewebe werden die T-Zellen dann entlang eines Chemokingradienten und weiterer chemotaktischer Mediatoren zu bestimmten Kompartimenten im Gewebe weitergeleitet⁶⁷.

1.2.2 Inflammatorische Chemokine in der Leber

Chemokine sind kleine chemotaktische Zytokine, die aufgrund der Position und Anzahl an konservierten Cystein-Resten im N-Terminus des Proteins in vier distinkte strukturelle Familien eingeteilt werden (C-, CC-, CXC- und CX3C Familie)⁶⁸. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Funktionen findet eine weitere Einteilung der Chemokine in funktionelle Gruppen statt⁶⁹. Die homöostatischen, konstitutiv exprimierten Chemokine dirigieren Leukozyten unter nicht-entzündlichen Bedingungen während der Hämatopoese in den primären lymphatischen Organen, während der Initiierung der adaptiven Immunantwort in den sekundären lymphatischen Organen und bei der Überwachung von gesundem peripheren Gewebe. Die meisten Chemokine repräsentieren jedoch die inflammatorische (oder induzierbare) Chemokingruppe, die die Rekrutierung von Leukozyten bei Infektionen, Entzündungen, Gewebsverletzungen oder zu Tumoren kontrolliert. Diese Chemokine werden in entzündeten Geweben durch residierende oder infiltrierende Zellen nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen oder Pathogenkontakt exprimiert. Inflammatorische Chemokine bestimmen sowohl die Zusammensetzung inflammatorischer Zellinfiltrate als auch deren Lokalisation im Gewebe^{67,69-71}. Inflammatorische CC Chemokine werden vornehmlich an den vaskulären Endothelien in den Portalfeldern der Leber detektiert, während CXC Chemokine bevorzugt vom sinusoiden Endothel exprimiert werden und in Infiltraten im Leberparenchym nachgewiesen werden können^{72,73}. Von zentraler Bedeutung für die Rekrutierung von T-Zellen in die Leber sind die Chemokine CXCR-3 und seine

Liganden CXCL-9, CXCL-10 und CXCL-11, dessen Expression bei Entzündungen der Leber stark ansteigt⁷⁴⁻⁸¹. So exprimieren intrahepatische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen größere Mengen CXCR-3 im Vergleich zu autologen T-Zellen im peripheren Blut⁸²⁻⁸⁴. CXCR-3 Liganden werden bei Entzündungen in der Leber verstärkt von LSECs exprimiert^{82,84}, können aber auch von Hepatozyten, Cholangiozyten (Gallengangsepithelzellen), Sternzellen und infiltrierenden Leukozyten sezerniert werden⁸⁵. Durch den Prozess der Transzytose können die in der Umgebung von LSECs sezernierten Chemokine dann von der basolateralen zur luminalen Oberfläche des Endothels transportiert werden⁷⁴. CCR-5 ist ein weiterer Chemokinrezeptor, der in entzündeten Lebern in hohen Frequenzen detektierbar ist^{73,84,86,87}. CCR-5 wird sowohl von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen als auch von proinflammatorischen T_H1 Zellen exprimiert⁸⁸. Seine Liganden werden vornehmlich an vaskulären Endothelien in den Portalfeldern der Leber detektiert und scheinen die Rekrutierung von CCR-5⁺ T-Zellen in die Portalfelder der Leber zu fördern^{89,90}. Der Chemokinligand CCL-20 kann bei verschiedenen Leberentzündungen in den Portalfeldern der Leber nachgewiesen werden⁹¹. CCL-20 wird u.a. von intrahepatischen Cholangiozyten exprimiert und fördert die Rekrutierung von CCR-6⁺ T-Zellen in die Leber. In einer Studie von Oo et al. wurde gezeigt, dass CCL-20 maßgeblich an der Rekrutierung von proinflammatorischen T_H17 Zellen und Tc17 Zellen (IL-17⁺CD8⁺ T-Zellen) in die entzündete Leber beteiligt ist⁹¹.

1.3 Intrahepatische CD4⁺ T-Zellen

CD4⁺ T-Zellen sind an der Induktion und Verstärkung von Entzündungsreaktionen sowie autoimmunen Erkrankungen maßgeblich beteiligt. Sowohl T_H1 Zellen als auch T_H17 Zellen werden sowohl mit der Pathogenese von Leberentzündungen als auch mit organ-spezifischen autoimmunen Erkrankungen assoziiert.

1.3.1 T_H1 Zellen

Die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen in verschiedene Subpopulationen ist von den Bedingungen abhängig, unter denen die primäre Aktivierung erfolgt. Einfluss auf die Differenzierung nehmen sowohl die Stärke der Stimulation und die Art der APCs als auch das umgebende Zytokinmilieu^{92,93}. In Anwesenheit von IL-12 wird die Differenzierung zu T_H1 Zellen induziert, die durch die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IFN γ und der Expression des Transkriptionsfaktors Tbet charakterisiert sind⁹⁴⁻⁹⁷. T_H1 Zellen nehmen eine Schlüsselrolle bei der zellulären Immunität ein und sind an der Abwehr intrazellulärer Pathogene beteiligt⁹⁸. Das T_H1 Effektorzytokin IFN γ aktiviert Makrophagen und fördert die Antigenprozessierung und Expression von MHC I und MHC II Molekülen auf APCs, wodurch adaptive Immunantworten initiiert und verstärkt werden können⁹⁹⁻¹⁰⁵. Sie sind zudem an der Regulation der CD8⁺ T-Zellantwort beteiligt¹⁰⁶. Neben IFN γ sezernieren T_H1 Zellen IL-2.

Beide Zytokine wirken stimulierend auf die CD8⁺ T-Zellantwort. IL-2 ist allgemein ein Wachstumsfaktor für T-Zellen und fördert die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen mit Erwerb des zytolytischen Phänotyps¹⁰⁷⁻¹¹⁰. Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen sezernieren zelltoxische Moleküle wie Perforin und Granzym und das proinflammatorische Zytokin IFN γ ^{111,112}, das sie jedoch im Gegensatz zu CD4⁺ T-Effektorzellen nur in geringen Mengen ausschütten¹¹³.

In verschiedenen Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass T_H1 Zellen maßgeblich an der Pathogenese von Leberentzündungen beteiligt sind. In einem Leberentzündungsmodell in TGF β -defizienten Mäusen wurden T_H1 Zellen als entscheidende Mediatoren der Leberentzündung identifiziert¹¹⁴. Die Leberschädigung konnte durch Deletion von CD4⁺ T-Zellen unterbunden werden und die Konzentration von IFN γ , das vornehmlich durch CD4⁺ T-Zellen sezerniert wurde, korrelierte mit dem Ausmaß der Hepatitis. In einem weiteren Modell, in dem die Leberentzündung durch *Propionibacterium acnes* ausgelöst wurde, wurden ebenfalls T_H1 Zellen als entscheidende Mediatoren der Leberentzündung identifiziert¹¹⁵⁻¹¹⁷. Durch Neutralisierung von IFN γ und IL-12, das die Differenzierung zu T_H1 Zellen induziert, konnte die Generierung der Leberentzündung in diesem Modell inhibiert werden. Unkontrollierte T_H1-Antworten gegen Autoantigene können zur Entwicklung autoimmuner Erkrankungen führen¹¹⁸. Dominierende T_H1-Antworten werden mit verschiedenen organspezifischen autoimmunen Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose, dem Typ 1 Diabetes, Morbus Crohn und der Rheumatoiden Arthritis assoziiert^{119,120}. Auch bei autoimmunen Lebererkrankungen scheinen T_H1 Zellen die dominierende Population leberinfiltrierender T-Zellen auszumachen¹²¹⁻¹²⁴. In verschiedenen Tiermodellen wie dem Modell der Experimentellen Autoimmunen Encephalomyelitis (EAE), im Modell der experimentellen Autoimmun-Uveitis (EAU) und im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) sind T_H1 Zellen entscheidend an der Pathogenese der Erkrankungen beteiligt¹²⁵⁻¹²⁹. So wurde beispielsweise im EAE-Modell gezeigt, dass der Schweregrad der Erkrankung mit einer erhöhten IFN γ -Sekretion durch T_H1 Zellen im Zentralen Nervensystem, dem Zielorgan der Autoimmunreaktion, korreliert^{130,131}. Auch der adoptive Transfer von IFN γ -produzierenden CD4⁺ T-Zellen führte zur Induktion der EAE, der EAU und weiterer autoimmuner Pathologien¹³², während Tbet-defiziente Mäuse, die eine deutliche Unterdrückung der IFN γ -Produktion in CD4⁺ T-Zellen zeigen, vor der Induktion einer EAE geschützt sind^{120,133}.

1.3.2 T_H17 Zellen

T_H17 Zellen gerieten aufgrund ihrer dualen Funktion in den Mittelpunkt des Interesses, da sie einerseits eine protektive Rolle gegen Infektionen einnehmen¹³⁴⁻¹³⁷, andererseits scheinen sie jedoch Gewebeschädigungen zu vermitteln und werden mit autoimmunen Erkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis, der Multiplen Sklerose und Morbus Crohn assoziiert¹³⁸⁻¹⁴².

Obwohl T_H17 Zellen eine eher kleine Fraktion inflammatorischer Zellen in der Leber ausmachen⁹¹, wird ihnen dennoch eine bedeutende Rolle bei verschiedenen Lebererkrankungen zugesprochen¹⁴³. Ein Anstieg der intrahepatischen T_H17 Zellzahl konnte sowohl in PBC-Patienten als auch in einem murinen PBC-Modell beobachtet werden^{144,145}. Auch an der Pathogenese der AIH scheinen T_H17 Zellen beteiligt zu sein. In AIH Patienten konnte eine erhöhte Anzahl an intrahepatischen T_H17 Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollen detektiert werden und die Frequenz leberinfiltrierender T_H17 Zellen korrelierte mit dem Entzündungsgrad der Lebererkrankung¹⁴⁶. Außerdem scheinen T_H17 Zellen an der Pathogenese der alkoholbedingten und der viralen Hepatitis beteiligt zu sein, bei denen die verringerte Frequenz intrahepatischer T_H17 Zellen mit einer Abnahme des Schweregrads der Leberentzündungen korreliert¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Die Anwesenheit von TGFβ und IL-6 oder IL-6 und IL-1β induziert die Differenzierung zu T_H17 Zellen¹⁵⁰⁻¹⁵³. T_H17 Zellen, die durch die Sekretion ihres namensgebenden Zytokins IL-17 gekennzeichnet sind, exprimieren den Transkriptionsfaktor RORγt (Maus) bzw. RORc (Mensch)¹⁵⁴. Das T_H17 Effektorzytokin IL-17 induziert die Produktion einer Vielzahl proinflammatorischer Mediatoren wie Zytokine und Chemokine, die die Migration von Neutrophilen Granulozyten (Neutrophile) und Makrophagen zum Entzündungsort steigern^{137,155-161}. Der proinflammatorische Effekt von IL-17 wird über den IL-17 Rezeptor (IL-17R) vermittelt, der von einer Vielzahl von Immunzellen und Gewebezellen exprimiert wird¹⁵⁶, darunter auch von leberresidierenden Zellen^{143,162}. In einer Studie von Zhao et al. wurde gezeigt, dass die Expression von IL-6 in Hepatozyten durch IL-17 gesteigert werden kann, was wiederum die weitere Konversion zu T_H17 Zellen in der Leber fördern könnte¹⁴⁶. Neben IL-17 sezernieren T_H17 Zellen IL-21, IL-22 und den Granulozyten Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF)^{106,140}, der in myeloiden Zellen die Expression von IL-1, IL-6, IL-23 und MHCII Molekülen verstärkt¹⁶³. Die durch IL-23 induzierte Expression von GM-CSF in T_H17 Zellen scheint kritisch für ihre inflammatorischen Eigenschaften zu sein und wurde mit einer gesteigerten Pathogenität der T_H17 Zellen assoziiert^{163,164}. Die Produktion von GM-CSF durch CD4⁺T-Zellen wurde zudem mit verschiedenen autoimmunen Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose, Myokarditis und Arthritis in Zusammenhang gebracht¹⁶⁵. T_H17 Zellen weisen eine hohe Plastizität auf und können, induziert durch IL-23, IL-1β oder IL-12, funktionelle Charakteristika von T_H1 Zellen annehmen, indem sie zusätzlich zu IL-17 auch IFNγ sezernieren¹⁶⁶⁻¹⁷¹. Diese sogenannten T_H1/T_H17 Zellen weisen eine gesteigerte Pathogenität auf und scheinen an der Entwicklung von Autoimmunität, bei Entzündungen des Darms und an der Abwehr von Mikroben beteiligt zu sein¹⁷¹⁻¹⁷⁶.

1.4 Regulation von Entzündungen

Da im Zuge einer Entzündungsreaktion auch körpereigenes Gewebe geschädigt wird, muss die Immunreaktion streng reguliert und möglichst schnell abgeschaltet werden, um die Immunhomöostase wieder herzustellen und unnötige Gewebeschädigungen zu vermeiden¹⁷⁷. Ebenso können Entzündungen, die mit autoimmunen Pathologien assoziiert sind, durch Reduktion proinflammatorischer Immunantworten begrenzt oder gar vermieden werden.

1.4.1 Periphere Regulationsmechanismen und IL-10

Durch periphere Regulationsmechanismen werden überschießende Immunantworten und autoreaktive T-Zellen reguliert¹⁷⁸. Zu diesen Mechanismen zählen u.a. die klonale Deletion von T-Effektorzellen, der Aktivierungs-induzierte Zelltod, die Expression von hemmenden Rezeptoren und die Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine wie IL-4, TGF β und IL-10¹⁷⁹⁻¹⁸². IL-10 ist ein pleiotropes Zytokin, das wichtige Funktionen bei der Regulation von Immunantworten einnimmt und die Immunhomöostase fördert¹⁸³. IL-10 wurde anfangs als T_H2 Zell-spezifisches Zytokin charakterisiert¹⁸⁴. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Sekretion von IL-10 auch mit Effektorantworten regulatorischer T-Zellen assoziiert ist¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. Regulatorische T-Zellen sind an der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz und der Immunhomöostase beteiligt, indem sie potentiell schädliche Immunantworten begrenzen können^{188,189}. So sind regulatorische T-Zellen in der Lage, Autoimmunität in Mäusen zu unterbinden¹⁸⁸. Zu den regulatorischen T-Zellen zählen Typ I regulatorische T-Zellen (Tr1 Zellen), T_H3 Zellen und CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen (Treg)^{190,191}. Tr1 Zellen und T_H3 Zellen sind durch die Sekretion großer Mengen an TGF β und IL-10 charakterisiert¹⁹². Tregs vermitteln Toleranz, indem sie modulatorisch auf die APC-Funktionen wirken oder die Proliferation und Zytokinsekretion autoreaktiver T-Zellen supprimieren^{193,194}. Bisher wurden verschiedene potentielle Wirkungsmechanismen der direkten und indirekten T-Zell-Suppression durch Tregs *in vitro* nachgewiesen. Tregs können beispielsweise über sezernierte oder inhibitorische Oberflächenmoleküle (Galektin-1 und CTLA-4), den Verbrauch von IL-2 oder die Produktion antiinflammatorischer Moleküle wie TGF β und IL-10 inhibitorisch wirken¹⁹⁵. Die Sekretion von IL-10 durch Tregs ist nach Antigenkontakt erhöht und es wird vermutet, dass die Ausschüttung von IL-10 durch Tregs die Induktion von T-Zellenergie fördert und so zur Toleranz beiträgt¹⁹⁶. Die Sekretion von IL-10 ist jedoch nicht auf T_H2 Zellen und regulatorische T-Zellen beschränkt, sondern kann von fast allen Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems, meist als Antwort auf einen aktivierenden Stimulus, produziert werden, hierunter DCs, Makrophagen, Neutrophile, B-Zellen und T-Zellen¹⁹⁷. Darüberhinaus konnte die IL-10-Sekretion in der Leber durch Hepatozyten, sinusoidale Endothelzellen, Kupffer Zellen, Sternzellen und Leber-assoziierte Lymphozyten

nachgewiesen werden¹⁹⁸⁻²⁰². Die Aktivität von IL-10 wird über seinen spezifischen Zelloberflächenrezeptorkomplex IL-10R vermittelt, der aus den zwei Untereinheiten IL-10R α und IL-10R β besteht^{201,203}. Die Untereinheit IL-10R α ist für die hochaffine Bindung von IL-10 an den Rezeptorkomplex verantwortlich²⁰⁴⁻²⁰⁷, IL-10R β hingegen trägt nur geringfügig zur Bindungsaffinität von IL-10 bei. Seine prinzipielle Aufgabe scheint in der Initiation der Signaltransduktion ins Zellinnere zu liegen. Nur Zellen, die sowohl IL-10R α als auch IL-10R β exprimieren, können effizient auf IL-10 reagieren²⁰⁸, während Zellen IL-10R β -defizienter Mäuse gegenüber IL-10 nicht responsiv sind^{208,209}. Lediglich wenige Kopien des IL-10R werden auf der Zelloberfläche exprimiert, wobei IL-10R β konstitutiv und ubiquitär exprimiert wird und IL-10R α vornehmlich auf Leukozyten detektierbar ist^{204-207,210-214}.

1.4.2 Regulation von Leberentzündungen durch IL-10

In verschiedenen Hepatitismodellen wurden hepatoprotektive Effekte von IL-10 auf die Leberpathologie beschrieben. In einem Modell der Galaktosamin/LPS-induzierten Leberentzündung führte die Administration eines Antikörpers gegen IL-10 zur Zunahme der Leberentzündung, und die Behandlung mit rekombinantem IL-10 verringerte die Hepatitis^{215,216}. Auch in einem Modell der durch ConcanavalinA (ConA) induzierten Hepatitis, bei der T-Zellen als entscheidende Mediatoren der Leberentzündung identifiziert wurden, schützte die Behandlung mit rekombinantem IL-10 vor der Ausbildung einer Leberentzündung, wohingegen IL-10 defiziente Mäuse (IL-10ko) eine stärkere Pathologie aufwiesen^{217,218}. Wurden Mäuse mit einer subletalen Dosis ConA vorbehandelt, führte dies zur verstärkten intrahepatischen IL-10 Expression, zur verminderten Produktion proinflammatorischer Zytokine und zur Reduktion der Leberschädigung²¹⁹. Dies deutet darauf hin, dass IL-10 maßgeblich an der Regulation von Leberentzündungen beteiligt ist. Wie genau IL-10 Leberentzündungen regulieren kann, ist bisher jedoch noch unzureichend verstanden. In einer Studie von Bliss et al. wurde beschrieben, dass IL-10 Leberentzündungen regulieren könnte, indem es die Migration extrahepatischer inflammatorischer T-Zellen in die Leber inhibieren kann²²⁰. Wie genau IL-10 dies vermittelt, ist jedoch noch unklar.

IL-10 kann antiinflammatorische Eigenschaften in APCs induzieren. So hemmt IL-10 in Monozyten und Makrophagen die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF α ¹⁹⁷. Zudem konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* Behandlung von DCs und Makrophagen mit IL-10 ihre antigenpräsentierenden Eigenschaften gegenüber CD4⁺ T Zellen inhibieren kann, indem die Expression von MHCII und kostimulatorischer Moleküle gehemmt wird²²¹. Neben den professionellen APC (DC, Makrophagen und B-Zellen) wurden in der Leber zudem LSECs als APCs beschrieben. *In vitro* führte die Behandlung von LSEC mit IL-10 als auch die Blockade der IL-10 Signalgebung zur reduzierten Expression von MHCII

und der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86^{222,223}. Außerdem exprimieren LSECs aus IL-10ko Mäusen weniger PD-L1 im Vergleich zu LSECs aus Wildtyp Mäusen. PD-L1 ist ein Ligand von PD-1, dessen Interaktion die Proliferation von T-Zellen inhibieren kann. Durch die modulierenden Effekte von IL-10 auf die APC-Funktion kann IL-10 somit indirekt die T-Zellfunktion beeinflussen, indem die Antigenpräsentation und somit auch die T-Zellaktivierung und ihre Zytokinproduktion gehemmt werden²²⁴⁻²²⁶. IL-10 kann aber auch direkt auf T-Zellen wirken, da auch T-Zellen den IL-10R exprimieren¹⁹⁷. So führte die spezifische Blockade der IL-10 Signalgebung in T-Zellen in einem Kolitismodell zum selektiven Anstieg proinflammatorischer CD4⁺ T-Zellen²²⁷. Daher scheint IL-10 auch direkt die inflammatorischen Eigenschaften von T-Zellen zu beeinflussen.

1.5 Autoimmune Lebererkrankungen

1.5.1 Ein Überblick

Bei Autoimmunerkrankungen richtet sich das Immunsystem gegen körpereigenes Gewebe, wobei die Ursachen hierfür noch unzureichend verstanden sind. Mögliche Gründe für Autoimmunerkrankungen können sein: a) eine unzureichende Selektion Autoantigen-spezifischer T-Zellen im Thymus, b) Reaktionen auf ein im inflammatorischen Kontext präsentiertes Autoantigen, c) strukturelle Ähnlichkeit zwischen Fremdanigenen und Autoantigenen (Molekulare Mimikry) oder d) Störungen der peripheren Immunregulation²²⁸⁻²³¹. Zu den autoimmunen Lebererkrankungen zählen die AIH, die PSC und die PBC²³². Diesen Erkrankungen ist gemein, dass das Immunsystem die Leber angreift. Bei der AIH kommt es zur Schädigung von Hepatozyten in der Leber, bei der PSC und PBC zur Schädigung von Cholangiozyten der größeren bzw. der kleineren Gallengänge. Die Ätiologie und Pathogenese dieser Erkrankungen sind bisher nur unvollständig verstanden. Störungen der Immunregulation scheinen an der Pathogenese autoimmuner Leberentzündungen beteiligt zu sein. So scheint sowohl die Anzahl als auch die Funktion regulatorischer T-Zellen bei Patienten mit autoimmunen Lebererkrankungen beeinträchtigt zu sein und die Expression antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 reduziert zu sein. Es wurde beschrieben, dass PSC-Patienten eine verringerte Treg-Frequenz im Vergleich zu gesunden Kontrollen aufweisen und ihre suppressive Funktion reduziert ist²³³. Bei der PSC exprimieren leberinfiltrierende Lymphozyten zudem weniger IL-10 im Vergleich zu Kontrollgruppen¹²³. Auch bei PBC-Patienten scheint die Treg-Frequenz vermindert zu sein²³⁴. Zudem wurden bei Patienten mit autoimmunen Lebererkrankungen wie der PBC und der AIH Polymorphismen im IL-10-Gen detektiert, die mit geringen IL-10 Expressionen assoziiert sind^{235,236}. In AIH-Patienten, die noch keine immunsuppressive Therapie erhalten haben, konnte außerdem eine geringere IL-10 Konzentration im Serum im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachgewiesen werden²³⁷. Eine gestörte Funktion bzw. verminderte Frequenz an

Leberantigen-spezifischen Tregs wird auch bei der AIH-Pathogenese diskutiert²³⁸. So wurde in verschiedenen Studien beschrieben, dass Treg im Vergleich zu gesunden Kontrollen in verringerter Anzahl vorhanden zu sein scheinen und Defekte in deren Funktion sowie eine verringerte Expression von Foxp3 im peripheren Blut aufweisen²³⁸⁻²⁴⁰. In einer aktuellen Studie von Peiseler et al., konnten diese Befunde allerdings nicht bestätigt werden²⁴¹.

1.5.2 Autoimmune Hepatitis

Die Autoimmune Hepatitis (AIH) ist eine Lebererkrankung mit unklarer Ätiologie und Pathomechanismus, bei der es zur Zerstörung des Leberparenchyms kommt²⁴². Wie bei den meisten autoimmunen Erkrankungen sind auch bei der AIH mehr Frauen als Männer betroffen (im Verhältnis 3.5:1)^{243,244}. Die genetische Prädisposition zeigt sich durch Assoziationen mit bestimmten HLA-Allelen (DR-3, DR-4), dem humanen MHCII, und anderen genetischen Polymorphismen²⁴⁵. Histologisch ist die AIH durch ein portales und periportales, im akuten Stadium auch lobuläres Infiltrat gekennzeichnet. Das Infiltrat setzt sich überwiegend aus T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen zusammen. CD4⁺ T-Zellen dominieren in den portalen Regionen, CD8⁺ T-Zellen im Bereich der Grenzzonenhepatitis^{240,246-248}. Die hepatischen T-Zellen weisen zudem eine Verschiebung des T-Zellrezeptorrepertoires auf, was auf eine oligoklonale Expansion der T-Zellen schließen lässt²⁴⁹. Serologisch lassen sich bei AIH-Patienten hohe Aminotransaminasenwerte, erhöhte γ -Globulinspiegel (Hypergammaglobulinämie) und Autoantikörper nachweisen²⁵⁰: Basierend auf den nachweisbaren Autoantikörpern wird die AIH in zwei Typen eingeteilt: Bei der AIH Typ 1 treten Antikörper gegen nukleäre Bestandteile (ANA), Antikörper gegen die glatte Muskulatur (SMA) und SLA/LP Antikörper gegen die O-Phosphoseryl-tRNA:SelenocysteinyI-tRNA-Synthase (SepSecS) auf. Die AIH Typ-2 ist gekennzeichnet durch LKM-1 Antikörper, die gegen Cytochrom P 450 2D6 (CYP2D6) gerichtet sind. SLA/LP Autoantikörper lassen sich bei etwa 10 %-30 % der AIH Patienten nachweisen und scheinen krankheitsspezifisch für die AIH zu sein, da sie im Gegensatz zu den anderen nachweisbaren Autoantikörpern nicht bei weiteren Lebererkrankungen und nicht-hepatischen autoimmunen Erkrankungen auftreten^{242,251-253}. SLA/LP Autoantikörper erkennen ein immundominantes carboxyterminales Epitop des SepSecS-Proteins und gehören vorrangig dem Immunglobulinsubtyp IgG1 an, was darauf hindeutet, dass sie bei allen Patienten durch eine ähnliche spezifische Immunantwort entstanden sind²⁵⁴. Zudem wurden Epitope des SepSecS-Proteins beschrieben, die von autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen erkannt werden²⁵⁵. In einer Studie von Zhao et al. wurde außerdem gezeigt, dass SepSecS-spezifische IFN γ -Antworten in AIH Patienten mit nachweisbaren SLA/LP Autoantikörpern signifikant höher als in Kontrollgruppen (Hepatitis B/C-Patienten, PBC-Patienten, AIH-Patienten ohne nachweisbare SLA/LP Autoantikörper,

Gesundkontrollen) sind²⁵⁶. Die Hepatozytenschädigung korreliert zudem mit der SepSecS-spezifischen CD4⁺ T-Zellantwort. SepSecS ist hochkonserviert und wird in der Leber, im Pankreas, in den Nieren, in der Lunge und in aktivierten Lymphozyten exprimiert^{252,257}.

1.6 Entwicklung des verwendeten Mausmodells

Die Erforschung autoimmuner Lebererkrankungen ist im Menschen aufgrund des heterogenen genetischen Hintergrundes der Patienten, der Diagnose im meist erst relativ späten Stadium der Erkrankung und des Mangels an Gewebepreparaten erschwert. Tiermodelle können Hilfestellung geben, um die Entstehung autoimmuner Lebererkrankungen sowie pathologische und immunologische Prozesse besser zu verstehen und neue Therapie- und Präventionsmöglichkeiten zu entwickeln. Das Tiermodell sollte grundlegende Charakteristika einbeziehen wie z.B. das Auftreten von Autoantikörpern, die Leberhistologie oder genetische Komponenten.

Bei den ersten murinen Tiermodellen einer Experimentellen Autoimmunen Hepatitis (EAH) wurde die Hepatitis durch wiederholte Injektion mit allogenen Leberhomogenisat zusammen mit dem Kompletten Freund's Adjuvant (CFA, *Complete Freund's Adjuvant*) ausgelöst, das nicht-infektiöse mikrobielle Bestandteile von Mykobakterien enthält und als Immunstimulator fungiert²⁵⁸. Durch den adoptiven Transfer von Lymphozyten aus sensibilisierten Tieren konnte eine Hepatitis in gesunden Empfängermäusen induziert werden, was einen zellulären Einfluss auf die Pathogenese der EAH verdeutlichte²⁵⁹. Später wurde der Überstand des Leberhomogenisats nach Ultrazentrifugation, der als S100 Fraktion bezeichnet wird, zur Induktion einer Hepatitis eingesetzt²⁶⁰, in dem u.a. das SepSecS Protein enthalten ist²⁶¹. Lohse et al. optimierten das Protokoll und konnten durch einmalige intraperitoneale Immunisierung mit S100 in Kombination mit CFA eine EAH auslösen. Sie verdeutlichten, dass der genetische Hintergrund des Mausstammes C57Bl/6 besonders suszeptibel für die Generierung einer Hepatitis war²⁶². Hierbei zeigten sich histologische Veränderungen der Leber, die mit einer Erhöhung der Serumtransaminasenwerte einherging. Auch charakteristische Autoantikörper konnten einige Wochen nach Induktion der Hepatitis nachgewiesen werden²⁶³. Zudem konnte die Hepatitis durch ConA stimulierte Milzzellen aus S100 immunisierten C57Bl/6 Mäusen auf syngene Mäuse transferiert werden.

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde ein Hepatitismodell durch Immunisierung mit SepSecS, dem prototypischen Autoantigen der AIH Typ 1, in einer Emulsion mit CFA entwickelt. Hierbei zeigte sich, dass Wildtyp C57Bl/6 Mäuse nach Immunisierung mit SepSecS in CFA keine histologisch erkennbare Hepatitis entwickelten. Jedoch waren IL-10ko Mäuse auf dem C57Bl/6 Hintergrund suszeptibel für die Generierung einer Hepatitis nach Immunisierung mit SepSecS in CFA, was den immunregulatorischen Einfluss von IL-10

auf die Entwicklung einer Hepatitis verdeutlichte²⁶⁴. Zudem konnten SepSecS-spezifische Autoantikörper im Serum detektiert werden (nicht veröffentlicht). Interessanterweise ließ sich die Hepatitis durch adoptiven Transfer von *ex vivo* mit ConA restimulierten Lymphknotenzellen SepSecS-immunisierter IL-10ko Mäuse in syngene Empfängermause übertragen²⁶⁵. Wurden Lymphknotenzellen aus SepSecS-immunisierten Wildtyp C57Bl/6 Mäusen transferiert, entwickelten die Empfängermause keine Hepatitis. ConA ist ein Pflanzenlektin, das T-Zellen polyklonal stimuliert²¹⁷, daher scheint die Hepatitis in den IL-10ko Mäusen T-Zellvermittelt zu sein. Zudem deutet dies darauf hin, dass der genetische Hintergrund der IL-10ko Mäuse eine Bedeutung beim Aktivierungs- und Differenzierungsprozess von T-Zellen haben könnte, was zu einer gesteigerten Infiltration inflammatorischer T-Zellen in die Leber führen könnte.

1.7 Zielsetzung

Die Pathogenese autoimmuner Lebererkrankungen ist bisher noch unzureichend verstanden. Störungen der Immunregulation scheinen jedoch eine entscheidende Ursache bei der Herausbildung dieser Erkrankungen zu sein. Vermutlich besteht eine Inbalance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Komponenten einer Immunantwort, bei der eine übermäßige, ungehemmte Aktivierung der Immunantwort begünstigt wird. Bei Patienten mit autoimmunen Lebererkrankungen konnten neben der dezimierten Anzahl regulatorischer T-Zellen sowie deren Funktionsverlust ebenfalls eine Reduktion der Expression anti-inflammatorischer Zytokine, wie beispielsweise IL-10, beobachtet werden. Bisher ist IL-10 als ein hepatoprotektives Zytokin beschrieben, das sowohl Lebererkrankungen als auch Gewebeschädigungen inhibieren kann. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, immunregulatorische Mechanismen von IL-10 zu identifizieren, welche die Progression von autoimmunen Lebererkrankungen beeinflussen können. Im ersten Teil der Arbeit sollte vergleichend in IL-10ko und Wildtyp Mäusen analysiert werden, ob und wie IL-10 die hepatische Akkumulation proinflammatorischer T-Zellen regulieren kann. Hierzu sollten sowohl funktionelle und phänotypische Charakterisierungen leberinfiltrierender T-Zellen als auch Expressionsanalysen inflammatorischer Chemokine erfolgen, die die Migration proinflammatorischer T-Zellen in die Leber fördern. Um den Einfluss von IL-10 auf die Pathogenese der Hepatitis und die Migration und Akkumulation Antigen-spezifischer und Antigen-unspezifischer proinflammatorischer T-Zellen differenziert betrachten zu können, sollten die Analysen sowohl nach Autoantigen-spezifischer als auch nach Autoantigen-unspezifischer Immunisierung der entsprechenden Mausgruppen durchgeführt werden. Basierend auf den hieraus gewonnenen Erkenntnissen sollte weiter untersucht werden, ob IL-10 die Differenzierung proinflammatorischer T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen reguliert und hierdurch zur verminderten Progression autoimmuner Leberentzündungen beitragen kann. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob IL-10 lediglich indirekt durch die beschriebenen inhibitorischen Effekte auf die APC-Funktionen agiert oder auch direkt die inflammatorischen Eigenschaften von CD4⁺ T-Zellen beeinflusst. Dazu sollten die Untersuchungen um ein zusätzliches Mausmodell erweitert werden, in dem die IL-10-Signalgebung spezifisch in T-Zellen blockiert ist, alle weiteren Zellpopulationen wie APCs jedoch weiterhin sensitiv gegenüber IL-10 bleiben. Mit Hilfe dieses Modells sollte analysiert werden, ob IL-10 auch direkt die Differenzierung und Effektorfunktionen proinflammatorischer T-Zellen reguliert und die Migration und Akkumulation proinflammatorischer T-Zellen in die Leber beeinflusst.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
CO ₂ Inkubator	SANYO Biomedica
Durchflusszytometer LSRII	BD Biosciences
Gefrierschrank -80 °C	Sanyo
Heizplatte (Präzitherm)	Harry Gestigkeit GmbH
Lichtmikroskop (Axiovert 40 CFL)	Carl Zeiss Microimaging
Magnetständer (MACS® MultiStand)	Miltenyi Biotec
Mikroskop BZ-9000	Keyence
Mikrotom (HM 335 E)	Microm
Neubauer Zählkammer	Optik Labor Fischknecht
Perfusionspumpe	DYNEX Technologies GmbH
pH-Meter S20 (SevenEasy™)	Mettler Toledo
Photometer (MRX TC II)	DYNEX Technologies GmbH
Pipettierhilfe (Pipetus)	Hirschmann Laborgeräte
Präparationsbesteck	VWR International GmbH
QuadroMACS™ Separator	Miltenyi Biotec
Schüttler, Thermomixer Comfort	Eppendorf AG
Spektrophotometer (NanoDrop™ 2000)	Peqlab Biotech
StepOnePlus (Real-Time PCR System)	Life Technologies
Thermocycler (DNA Engine Dyad)	MJ Research
Vortex-Mixer (Reax 2000)	Heidolph Instruments GmbH
Waage (Scout™Pro)	Ohaus
Wasserbad	GFL
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG
Zentrifuge (Megafuge 2.0)	Heraeus Instruments GmbH

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produktbezeichnung	Hersteller
Abdeckfolie (MicroAMP™ Optical Adhesive Film)	Life Technologies
Deckgläser 24 x 60	Fa. Marienfeld
Kanülen, BD Microlance	BD Biosciences
LS-Säule	Miltenyi Biotec
Maxisorp Mikrotiterplatten	Nunc
Nylonsieb Cell Strainer 40 µm, 100 µm	BD Biosciences

Produktbezeichnung	Hersteller
Pipettenspitzen	Sarstedt
Platten MicroAMP®Fast Optical 96-well Format	Life Technologies
Reaktionsgefäße 1.5 mL, 2 mL	Sarstedt
Reaktionsgefäße 15 mL, 50 mL	Grainer Bio-one
Reaktionsgefäße (Multiply®-µStrip Pro,8er Kette)	Sarstedt
Röhrchen 5 mL, Flow Cytometry	Sarstedt
Schottflaschen	Schütt Labortechnik
Spritzen, BP Plastikpak	BD Biosciences
Stabpipetten	Greiner Bio-one
Steriflip Filter (0.22 µm)	Merck Millipore
Sterilfilter Filtropur V50	Sarstedt
Superfrost-Objektträger	Karl Hecht
Zellkulturplatten Flachboden, Rundboden; 96- well Format	Sarstedt

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Produktbezeichnung	Hersteller
Komplettes Freund's Adjuvant (CFA)	Difco Laboratories
AntifectRN liquid	Schülke und Meyer
Aqua ad injectabilia	Baxter
Biotin Rat anti Mouse CD4 (Klon H129.19)	BD Biosciences
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH
CD11c MicroBeads	Miltenyi Biotec
Cytofix/Cytoperm™	BD Biosciences
CompBeads Anti-Rat+Anti Hamster Ig,k	BD Biosciences
Eindeckmedium Eukitt	O. Kindler GmbH
Eisessig	Carl Roth
Ethanol	Carl Roth
Eosinlösung (0.5 %, wässrig)	Carl Roth
FACS Flow™	BD Biosciences
Fc Block, Anti-Mouse CD16/CD32	eBioscience
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen
Formaldehydlösung 37 %	Carl Roth
Golgi-Plug (Brefeldin A)	BD Biosciences
IMDM Medium [-] L-Glutamin	Gibco
Ionomycin	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Ketamin	aniMedica GmbH
Meyer's Häkalaun (gebrauchsfertig)	Carl Roth

Produktbezeichnung	Hersteller
Optiprep	Sigma-Aldrich
Pacific Orange Succimidyl Ester	Invitrogen
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen
Perm/Wash™	BD Biosciences
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich
Purified NA/LE Hamster Anti-Mouse CD3e	BD Biosciences
Purified NA/LE Hamster Anti-Mouse CD28	BD Biosciences
Reine Werkbank (BDK)	Luft und Reinraumtechnik GmbH
Rompun 2%	Bayer Vital GmbH
Schwefelsäure 2N Lösung	Carl Roth
Streptavidin MicroBeads	Miltenyi Biotec
TMB Plus Ready-to-use Substrate	Kementec Diagnostics
Triton X 100	Carl Roth
Trypanblau (0,4 %)	Invitrogen
Xylol	O. Kindler GmbH

2.1.4 Puffer, Lösungen und Medien

Das Fetale Kälberserum (FKS) wurde vor der Verwendung zur Inaktivierung von Komplementfaktoren für 30 min bei 56°C erhitzt. Die für die Medien verwendeten Zusätze wurden steril filtriert (Porengröße 0,22 µm).

1xACK

150 mM EDTA
 10 mM KHCO₃
 150 mM NH₄Cl

Eosinlösung

0.5 % Eosinlösung
 75 µL Eisessig/100mL Eosinlösung

4 %-ige Formalinlösung gepuffert, pH 7.4 (in 1L Wasser)

140 mL Formalin (37 %)
 66 mM KH₂PO₄
 66 mM Na₂HPO₄

MACS-Puffer (in 1x PBS)

0.5 % BSA
2.5 mM EDTA

1xPBS, pH 7.4

2.7 mM KCl
1.5 mM KH₂PO₄
137 mM NaCl
6.5 mM Na₂HPO₄

Zellkulturmedium (IMDM)

10 % FKS (hitzeinaktiviert, 30 min, 56 °C)
1 % Penicillin/Streptomycin

2.1.5 Kits

Produktbezeichnung	Hersteller
KAPA™ PROBE FAST qPCR MasterMix Universal	Peqlab
First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR	Roche Diagnostics Deutschland GmbH,
mouse IL-17 DuoSet ELISA Development System	R&D Systems
mouse IFN γ DuoSet ELISA Development System	R&D Systems
Mouse GM-CSF DuoSet ELISA Development System	R&D Systems
NucleoSpin® TriPrep	Macherey-Nagel

2.1.6 Antikörper und Proteine

Antikörperbezeichnung	Klon	Isotyp	Hersteller
B220 FITC	RA3-6B2	Rat IgG2a, κ	BD Biosciences
B220 PE	RA3-6B2	Rat IgG2a, κ	BD Biosciences
CD3 AlexaFluor700	17A2	Rat IgG2b, κ	BD Biosciences
CD4 PacificBlue	GK.1.5	Rat IgG2b, κ	BioLegend
CD4 BrilliantViolet421	GK1.5	Rat IgG2b, κ	Biolegend
CD8 APC	53-6.7	Rat IgG2a, κ	BD Biosciences
CD8 FITC	53-6.7	Rat IgG2a, κ	Biolegend
CD8 V450	53-6.7	Rat IgG2a, κ	BD Biosciences
CD11b FITC	M1/70	Rat IgG2b, κ	BD Biosciences

Antikörperbezeichnung	Klon	Isotyp	Hersteller
CD45.2 APC	104	Mouse IgG2a, κ	BD Biosciences
CD45.2 FITC	104	Mouse IgG2a, κ	eBioscience
CD45.2 PE	104	Mouse IgG2a, κ	BioLegend
F4/80 APC	BM8	Rat IgG2a, κ	BioLegend
GM-CSF FITC	MP1-22E9	Rat IgG2a, κ	BioLegend
IFN γ APC	XMG1.2	Rat IgG1, κ	BD Biosciences
IL-17A PE	TC11-18H10	Rat IgG1, κ	BD Biosciences
Ly6G V450	1A8	Rat IgG2a, κ	BioLegend

2.1.7 Primersonden für die quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

Alle verwendeten TaqMan® Gene Expression Assays wurden von der Firma Life Technologies bezogen.

Zielgen	Spezies	Artikelnummer
CCL-20	Maus	Mm00444228_m1
CCR-5	Maus	Mm0126171_m1
CCR-6	Maus	Mm01323931_m1
CD80	Maus	Mm00711660_m1
CD86	Maus	Mm00444543_m1
CXCL-9	Maus	Mm00434946_m1
CXCL-10	Maus	Mm00445235_m1
CXCL-11	Maus	Mm00444662_m1
CXCR-3	Maus	Mm99999054_s1
GAPDH	Maus	Mm03302249_g1
H2-Ab1 (MHCII)	Maus	Mm00439216_m1
IL-1 β	Maus	Mm00434228_m1
IL-6	Maus	Mm00446190_m1
IL-23a	Maus	Mm01160011_g1
Pdcd1 (PD-1)	Maus	Mm01285676_m1
ROR γ t/RORc	Maus	Mm01261022_m1
Tbx21 (Tbet)	Maus	Mm00450960_m1
TGF β 1	Maus	Mm01178820_m1

2.1.8 verwendete Software

Produktbezeichnung	Hersteller
BD FACSDiva6	BD Biosciences
GraphPad Prism	GraphPad Software Inc.
Microsoft Office	Microsoft Corporation
NanoDrop2000/2000c	ThermoScientific
StepOnePlus™ Software V2.1	Life Technologies

2.2 Versuchstiere und ihre Behandlung

Alle verwendeten Mäuse wurden in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gezüchtet und gehalten. Sämtliche Tiere wurden unter spezifisch Pathogen-freien (SPF) Bedingungen bei einer konstanten Temperatur von 20°C gehalten und erhielten Wasser und Futter *ad libitum*. Die Durchführung der Tierexperimente wurde von der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt. Es wurden Mäuse des Hintergrund-Stammes C57Bl/6 verwendet.

Linie	Besonderheiten
Wildtyp C57Bl/6	
IL-10 knock-out (IL-10ko)	
CD4dnIL-10R α	Expriemieren den dominant-negativen IL-10R α unter der Kontrolle des CD4-Promotors ²⁶⁶

Proteine und Antikörper	
murines SepSecS-Protein	laboreigene Herstellung
IL-10R Antikörper (Klon 1B1)	von Prof. Dr. Samuel Huber, Hamburg, zur Verfügung gestellt

2.2.1 Induktion einer Hepatitis

Zwecks Induktion einer Hepatitis erfolgte eine zweimalige intraperitoneale Injektion von 100 μ L einer Emulsion aus SepSecS/CFA (10 μ g SepSecS in 50 μ L PBS, 50 μ L CFA) oder PBS/CFA (1:1 Gemisch) jeweils im Abstand von drei Wochen. Zehn Tage nach der zweiten Immunisierung wurden die Mäuse sakrifiziert und die Leber zur weiteren Untersuchung entnommen. Das Adjuvanz CFA enthält Manidmonooleat und Paraffinöl, bildet mit dem Proteinantigen eine Emulsion und dient als Depot des Antigens, das hieraus langsam freigesetzt wird. Zudem enthält CFA hitze-inaktivierte getrocknete Tuberkelbazillen (*Mycobacterium tuberculosis*) und dient hierdurch als unspezifischer Aktivator des Immunsystems²⁶⁷. Um den Einfluss von IL-10 überprüfen zu können, wurden Wildtyp

C57Bl/6 Mäuse zusätzlich zur Immunisierung einmal wöchentlich durch intraperitoneale Injektion mit einem Antikörper gegen den IL-10R (150 µg/Maus) behandelt.

2.2.2 Immunisierungen zur Analyse der Initiation der Immunantwort im Lymphknoten

Neben der Induktion einer Hepatitis stand auch die nähere Charakterisierung der antigen-spezifischen Immunantwort im Fokus der Untersuchungen. Hierfür wurden die Versuchstiere durch subkutane Injektion von SepSecS/CFA (10 µg SepSecS in 50 µL PBS, 50 µL CFA) oder PBS/CFA (1:1 Gemisch) in die Hinterpfoten (50 µL/Pfote) immunisiert. Zehn Tage nach der Immunisierung wurden die poplitealen Lymphknoten entnommen.

2.3 Isolation primärer Zellen

Für die Organentnahme wurden die Mäuse mittels zervikaler Dislokation unter Narkose (Ketamin:Rompun:PBS im Verhältnis 1:0.8:1, 200 µL/Maus intraperitoneal) sakrifiziert.

2.3.1 Isolation mononukleärer Zellen aus der Leber

Für die Isolation mononukleärer Zellen aus der Leber wurde die Leber zunächst über die hintere Hohlvene (Vena cava caudalis) unter Eröffnung der Pfortader (Vena portalis) mit 5 mL PBS perfundiert. Die Leber wurde freipräpariert, entnommen und die Gallenblase entfernt. Anschließend wurde die Leber gewogen und mit einem Spritzenkolben durch ein 100 µm Sieb gerieben und zur Entfernung der Hepatozyten auf 50 mL mit PBS aufgefüllt und für 4 Minuten (min) bei 400rpm zentrifugiert. Hierdurch konnten sich die Hepatozyten absetzen und verblieben im Pellet. Der Überstand wurde abgenommen und nochmals für 4 min bei 400rpm zentrifugiert, um weitere Hepatozyten zu entfernen. Der Überstand wurde daraufhin für 7 min bei 1500rpm zentrifugiert und das entstandene Pellet in 4.5 mL PBS aufgenommen. Die Suspension wurde mit 2.5 mL Optiprep gemischt und durch vorsichtiges Überschichten mit 1 mL PBS ein Dichtegradient hergestellt. Anschließend wurde der Gradient bei RT für 20 min bei 400g mit inaktiver Bremse zentrifugiert. Die mononukleären Zellen befanden sich in der Intermediärphase zwischen PBS und den Erythrozyten sowie Hepatozyten. Die Leukozyten wurden abpipettiert, in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 20 mL PBS aufgefüllt und für 5 min bei 1500rpm zentrifugiert. Im entstandenen Pellet befanden sich nun die mononukleären Zellen. Das Pellet wurde makroskopisch auf die Anwesenheit von Erythrozyten überprüft, ggf. schloss sich nun eine Erythrozytenlyse (Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat - (ACK)-Lyse) an. Hierzu wurden die Zellen mit 1mL ACK-Puffer versetzt. Nach einminütiger Inkubation wurde die Reaktion mit 10 mL PBS gestoppt. Nach einer erneuten Zentrifugation für 5 min bei 1500rpm, wurden die Leberleukozyten in Zellkulturmedium resuspendiert und gezählt (s. Abschnitt 2.4.1).

2.3.2 Isolation von CD11c⁺ Dendritischer Zellen aus der Milz

Für die Isolation primärer Milzzellen wurde die Milz der Versuchstiere entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Hierzu wurde die Milz mit einem Spritzenkolben durch ein Sieb (100 µm) in ein 50 mL Reaktionsgefäß gerieben und gewaschen (mit PBS aufgefüllt und abzentrifugiert; Standardbedingungen: fünf min, 430g, Raumtemperatur (RT)). Es folgte eine Erythrozytenlyse (s. Abschnitt 2.3.1). Nach Abstoppen der Reaktion wurde die Suspension erneut durch ein Sieb (40 µm) gerieben, zentrifugiert und gezählt. Die Zellen wurden nun magnetisch markiert und anschließend sortiert (*Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS)). Die Zellen wurden nach einem weiteren Zentrifugationsschritt in MACS-Puffer (1 mL/10⁸ Zellen) resuspendiert und mit CD11c-Magnetbeads (25 µL/mL MACS-Puffer) für 15 min bei 4 °C inkubiert. Eine vorgekühlte LS-Säule wurde an einen Magneten gekoppelt und mit 3 mL MACS-Puffer äquilibriert. Nach dem Waschen der Zellen, wurden diese in 1 mL MACS-Puffer aufgenommen und auf die äquilibrierte LS-Säule gegeben. Nach Beladung der Säule mit der Zellsuspension wurde diese dreimal mit 3 mL MACS-Puffer gespült und der Durchlauf verworfen. Anschließend wurden die magnetisch an die Säule gekoppelten dendritischen Zellen eluiert. Hierzu wurde die Säule mit 5 mL MACS-Puffer gefüllt, aus dem Magneten gelöst und die Zellen mit Hilfe eines Spritzenstempels in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden zentrifugiert, in Zellkulturmedium aufgenommen und gezählt (s. Abschnitt 2.4.1).

2.3.3 Isolation mononukleärer Zellen aus den poplitealen Lymphknoten

Zur Isolation von mononukleären Zellen aus den Lymphknoten wurden die Oberschenkelmuskeln der Maus freigelegt. Der Muskel wurde unterhalb der Vena femoralis längs eingeschnitten und auseinandergezogen. Die poplitealen Lymphknoten wurden hierdurch gut zugänglich und konnten nun mit einer Pinzette entnommen werden. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde der Lymphknoten mit Hilfe eines Spitzenstempels durch ein Sieb (100 µm) gerieben. Daraufhin wurde die Suspension gewaschen, in Zellkulturmedium aufgenommen und gezählt (s. Abschnitt 2.4.1).

2.3.4 Isolation von CD4⁺ T-Zellen aus der Leber und den poplitealen Lymphknoten

Zur Isolation von CD4⁺ T-Zellen wurden mononukleäre Zellen aus der Leber oder den Lymphknoten isoliert (s. Abschnitt 2.3.1 und 2.3.3) und magnetisch mittels MACS isoliert. Hierzu wurden die Zellen in MACS-Puffer (1 mL/10⁸ Zellen) und Biotin-gekoppelten anti-CD4 Antikörper (AK) für 15 min bei 4 °C inkubiert (1.5 µL/10⁸ Zellen). Anschließend wurden die Zellen gewaschen, in MACS-Puffer (1 mL/10⁸ Zellen) aufgenommen und mit Streptavidin-gekoppelten Magnetbeads (25 µL/10⁸ Zellen) für 10 min bei 4 °C inkubiert. Zwei LS-Säulen wurden an Magneten gekoppelt und equilibriert (s. Abschnitt 2.3.2). Nach einem erneuten

Waschschrift wurden die Zellen in 1 mL MACS-Puffer aufgenommen und auf die Säule gegeben. Die Säule wurde dreimal mit 3 mL MACS-Puffer gespült und der Durchfluss verworfen. Die Elution der Zellen erfolgte durch Ablösung des Magneten und Zugabe von 5 mL MACS-Puffer mit Hilfe eines Spitzenstempels in die zweite LS-Säule. Erneut wurde dreimal mit je 3 mL MACS-Puffer gewaschen und der Durchlauf verworfen. Die Zellen wurden mit 5 mL MACS-Puffer von der Säule unter Entfernung des Magneten eluiert, gewaschen, in Zellkulturmedium aufgenommen und gezählt (s. Abschnitt 2.4.1). Die Reinheit der so isolierten CD4⁺ T-Zellen betrug 95-98 %.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzählung wurde ein Aliquot der entsprechenden Zellsuspension in einer Trypanblaulösung (1:10, Trypanblau:PBS) verdünnt und die Zellkonzentration in einer Neubauer-Zählkammer durch Auszählung der Zellen in den vier Großquadraten unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors bestimmt. Vitale Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf, da die Zellmembran hierfür undurchlässig ist. Somit lassen sie sich von den tiefblau gefärbten toten Zellen unterscheiden. Die Zellzahl ließ sich anhand der folgenden Formel errechnen:

Zellzahl = gezählte Zellzahl / 4 x Verdünnungsfaktor x Volumen x Kammerfaktor (10^4)

2.4.2 Restimulation von Zellen für die Detektion von Zytokinen im Zellkulturüberstand

Alle Stimulationsexperimente wurden unter der Sterilbank in Zellkulturplatten mit Flachboden im 96-well Format mit einem Endvolumen von 250 μ L Zellkulturmedium angesetzt. Dabei wurde jeder Ansatz mindestens in Dreifachwerten angesetzt. Zellkulturplatten wurden mit anti-CD3 AK (Purified NA/LE Hamster Anti-Mouse CD3e) gecoatet (3 μ g/mL, 50 μ L/well, <1 h bei 37 °C) und ungebundener AK anschließend durch Waschen mit PBS entfernt. Für die *in vitro* Stimulationen von Leukozyten wurden 5×10^5 Leukozyten/well eingesetzt. In einigen Versuchen wurde zusätzlich ein anti-CD28 AK (Purified NA/LE Hamster Anti-Mouse CD28) in einer Konzentration von 3 μ g/mL zu den Stimulationsansätzen gegeben. Die Stimulation erfolgte bei 37 °C im Brutschrank und nach 24 h wurden die Zellkulturüberstände abgenommen. Zur Stimulation von CD4⁺ T-Zellen wurden 2.5×10^5 Zellen/well eingesetzt und mit anti-CD3 AKs wie oben beschrieben für 24 h bei 37 °C stimuliert. Zur Detektion von Zytokinen SepSecS-spezifischer CD4⁺ T-Zellen wurden 2.5×10^5 Zellen/well in Gegenwart Dendritischer Zellen 5×10^4 /well aus der Milz nicht immunisierter Mäuse mit SepSecS (4 μ g/mL) für 24 h bei 37 °C im Brutschrank stimuliert. Bis zur weiteren Analyse wurden die Überstände bei -20 °C gelagert.

2.4.3 Restimulation von Zellen für die intrazelluläre Färbung von Zytokinen

Die zu untersuchenden Zellen wurden in einer 96-well Rundbodenplatte (1×10^6 in 200 μL Zellkultumedium) ausplattiert und mit einem BrefeldinA-haltigen Proteintransport-Inhibitor (Golgi-Plug 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$) behandelt, um eine Akkumulation der Zytokine im Golgiapparat zu ermöglichen. Durch Zugabe von Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)/Ionomycin (50 ng/mL / 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) wurden die Zellen aktiviert und über 4 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und für durchflusszytometrische Analysen gefärbt (s. Abschnitt 2.6).

2.5 Zytokinbestimmung im Zellkulturüberstand

Die Detektion von Zytokinen im Zellkulturüberstand erfolgte mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). Das Testprinzip basiert auf der Verwendung von Antikörpern, die jeweils unterschiedliche Epitope des zu detektierenden Zytokins erkennen. Ein Antikörper wird hierbei immobilisiert. Nach Bindung des Zytokins an den immobilisierten Antikörper, erfolgt die Zugabe des zweiten biotinylierten Antikörpers und Streptavidin-gekoppelter Meerrettich-Peroxidase. Anschließend kommt es durch das zugegebene Substrat Tetramethylbenzidin (TMB, fertige Gebrauchslösung) zu einem Farbumschlag, der photometrisch detektiert werden kann. Die Konzentration des Zytokins im Zellkulturüberstand konnte hierbei durch eine simultan gemessene Standardreihe bestimmt werden. Alle Zytokinbestimmungen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.6 Durchflusszytometrische Analysen

Soweit nicht anders angegeben, erfolgten die Waschschrte im Folgenden durch Zugabe von 2 mL PBS, anschließender Zentrifugation (430g für 5 min bei 4 °C) und Abdekantieren des Überstandes.

2.6.1 Vitalitätstest

Zur Unterscheidung lebender und toter Zellen in durchflusszytometrischen Analysen, wurden die Zellen vor der Oberflächenfärbung (s. Abschnitt 2.6.2) mit Pacific Orange Succimidyl Ester (PacO-NHS) gefärbt. Das Prinzip dieser Färbung beruht darauf, dass der Farbstoff in tote Zellen eindringt und hier mit freien Aminen reagiert, jedoch nicht in lebende Zellen mit intakter Zellmembran. Somit konnten tote Zellen auf Grund der höheren Fluoreszenzintensität von lebenden Zellen unterschieden werden. Die Zellen (1×10^6 - 2×10^6) wurden in 5 mL Röhrchen gewaschen, der Überstand abdekantiert und die Zellen mit 200 μL einer 1:1000 Verdünnung der 1.34 mM Stammlösung für 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen mit 2 mL PBS und anschließender Zentrifugation

bei 430g für 5 min bei 4 °C, erfolgte dann die Färbung von Oberflächenmarkern (s. Abschnitt 2.6.2).

2.6.2 Färbung von Oberflächenmarkern

Für die Färbung von Oberflächenmarkern erfolgte die Aufnahme der Zellen (1×10^6 - 2×10^6) in 50 μ L PBS. Wurden präselektierte Lymphozyten gefärbt, so war kein weiteres Blocken notwendig. Wurden allerdings Makrophagen oder Neutrophile Granulozyten gefärbt, so wurden zunächst die Fc-Rezeptoren der Zellen mit 50 μ L Fc-Block (1:10 verdünnt in PBS) für 15 min bei 4 °C geblockt. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen wieder in 50 μ L PBS aufgenommen. Daraufhin erfolgte die Anfärbung der Oberflächenmarker mit Zugabe von je 1 μ L der Fluoreszenzmarkierten AK für 15 min bei 4 °C im Dunkeln. Danach wurden die Zellen erneut gewaschen. Wurden anschließend noch intrazelluläre Färbungen durchgeführt, so wurde wie in Abschnitt 2.6.3 weiter vorgegangen. Erfolgt keine weiteren Färbungen, wurden die Zellen in 4 %igen PFA für 15 min bei 4 °C fixiert, anschließend gewaschen und für die durchflusszytometrische Messung in 200-300 μ L PBS aufgenommen.

2.6.3 Intrazelluläre Färbungen

Für die intrazelluläre Färbung von Zytokinen wurden die Zellmembranen der Zellen durch Resuspension mit 250 μ L Cytofix/Cytoperm für 20 min bei 4 °C permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 2 mL Waschpuffer (Perm/Wash, 1:10 verdünnt in aqua bidest) gewaschen. Nach den Waschschriften wurden die Zellen in einem Reaktionsvolumen von 50 μ L durch Zugabe von 1 μ L des jeweiligen Fluoreszenzmarkierten AK gefärbt (>30 min oder über Nacht bei 4 °C im Dunkeln). Danach wurden die Zellen erneut in 2 mL Waschpuffer gewaschen und für die durchflusszytometrische Messung in 200-300 μ L PBS aufgenommen.

2.6.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenproteinen und intrazellulären Proteinen mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper. Durch Verwendung unterschiedlich markierter Antikörper können mehrere Moleküle auf und in einer Zelle in einem Ansatz gleichzeitig nachgewiesen werden. Mit Überdruck wird die Zellsuspension im Durchflusszytometer in eine Messkammer geleitet, in der die Zellen einzeln einen Laserstrahl passieren. Dadurch werden die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt, die daraufhin Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Das Licht wird durch ein komplexes System aus Spiegeln und Filtern im Durchflusszytometer gebündelt und zerlegt. Dadurch erhält man für jeden unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff ein spezifisches Signal. Die meisten Fluoreszenzfarbstoffe strahlen jedoch nicht strikt eine Farbe aus, sondern ein gut

charakterisiertes Farbspektrum. Dadurch kann das Fluoreszenzsignal eines Fluoreszenzfarbstoffes nicht nur in den dafür vorgesehenen Kanal gelangen, sondern auch in anderen Kanälen einen schwachen Impuls aussenden. Daher ist es unabdingbar, eine Kompensation durchzuführen, mit deren Hilfe die spektralen Überlappungen der Fluoreszenzsignale verschiedener Farbstoffe korrigiert werden können. Für die Kompensation wurden sogenannte *CompBeads* mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern der zu messenden Moleküle angefärbt. Hierzu wurde ein Tropfen der *CompBeads* in einem 5 mL Röhrchen mit 1 μ L jeweils eines Fluoreszenzmarkierten Antikörpers für 15 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden ungebundene Antikörper durch Waschen mit 2 mL PBS und Zentrifugation bei 430g für 5 min bei 4 °C entfernt. Der Überstand wurde abdekantiert und die gefärbten *CompBeads* in 200 μ L PBS aufgenommen. Die gefärbten *CompBeads* wurden dann für die Kompensation im Durchflusszytometer eingesetzt. Ebenso wurden ungefärbte Zellen bei der Kompensation verwendet, um die Autofluoreszenz der Zellen in die Kompensation einzubeziehen. Zusätzlich wurden Isotypkontrollen mitgefärbt, um unspezifische Bindungen der eingesetzten Antikörper auszuschließen. Tote Zellen wie auch Zelldoubletten wurden nicht in die Analysen mit einbezogen. Die Messungen wurden mit der Software BD FACSDiva6 ausgewertet.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 RNA-Isolation aus Lebergewebe

Zur Vorbereitung für die RNA-Isolierung wurde Lebergewebe entnommen (s. Abschnitt 2.3.1), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bis zur Isolierung der RNA bei -80 °C gelagert. Die weitere Aufreinigung und Anreicherung der Gesamt-RNA erfolgte mithilfe des NucleoSpin® TriPrep Kits nach Herstellerangaben. Die RNA wurde in 50 μ L RNase freiem Wasser eluiert und bei -80 °C gelagert.

2.7.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration wurde durch eine photometrische Messung mittels *Nanodrop* durch Erfassung der Signalstärke (OD, optische Dichte) bei einer Anregung von 260 nm vorgenommen. Hierbei erfolgte zusätzlich die Messung der OD bei 230 nm und 280 nm zur Bestimmung von Kontaminationen durch Proteine (280 nm) und Lösungsmittelrückstände (230 nm). Hierbei gelten die $OD_{260}/OD_{230} \geq 2$ sowie $OD_{260}/OD_{280} \geq 2$ für reine RNA.

2.7.3 cDNA-Synthese

Mithilfe der reversen Transkription konnte aus der isolierten RNA cDNA synthetisiert werden. Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem „First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR“ nach

Herstellerangaben. Ein Reaktionsansatz bestand hierbei aus folgenden Komponenten (Tabelle 1):

Tabelle 1: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die reverse Transkription

Komponente	Menge/Ansatz
RNA	1 µg
10x Reaktionspuffer	1x
MgCl ₂	5 mM
dNTPs	1 mM
Oligo-p(dT) ₁₅ Primer	1.6 µg
RNase Inhibitor	50 U
Reverse Transkriptase	≥ 20 U
add RNase freies Wasser	20 µL

Die Proben wurden für 10 min bei 25 °C, danach für 60 min bei 42 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Denaturierung der Reversen Transkriptase für 5 min bei 99 °C. Danach wurden die Proben im Verhältnis 1:4 mit RNase-freien Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert.

2.7.4 Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) basiert auf dem Prinzip einer konventionellen PCR, ermöglicht jedoch zusätzlich die Quantifizierung des Amplifikats. Für die qRT-PCR wurden hier „TaqMan® Gene Expression Assays“ verwendet. Diese enthalten zum einen ungelabelte Primerpaare, die der Amplifikation der entsprechenden DNA dienen, zum anderen eine sequenzspezifische Sonde, die mit dem Fluorophor FAM (6-Carboxyfluorescein) und dem sogenannten Quencher MGB (*Minor Groove Binder*, MGB) verbunden ist. Nach Bindung der Sonde an die komplementäre Zielsequenz, wird die Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der eingesetzten Polymerase degradiert und das Fluorophor freigesetzt. Das hierdurch detektierbare Fluoreszenzsignal dient dann zur Quantifizierung des Amplifikats.

Alle folgenden Pipettierarbeiten wurden auf Eis durchgeführt. Um eventuell auftretende Kontaminationen zu detektieren, wurde pro Mastermix eine Wasserkontrolle gemessen. Alle Proben wurden in Duplikaten bestimmt. Reagenzien für den Mastermix der qRT-PCR stammten aus dem Kit „KAPA™ PROBE FAST qPCR MasterMix Universal“. In Tabelle 2 ist die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für die qRT-PCR dargestellt.

Tabelle 2: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für die qRT-PCR

Komponente	Menge/Ansatz
Template (cDNA)	4.3 µL
KAPA PROBE FAST qPCR Mastermix (2x)	5 µL
ROX Reference Dye High (50x)	0.2 µL
TaqMan® Gene Expression Assay	0.5 µL

Die qRT-PCR-Platte (MicroAMP®Fast Optical) wurde mit Abdeckfolie verschlossen und die Proben im StepOnePlus mit folgendem Temperaturprofil gemessen (Tabelle 3):

Tabelle 3: Temperaturprofil der qRT-PCR

Phasen	Temperatur/Zeit	
Initiale Denaturierung	95 °C/ 20 sec	
Denaturierung	95 °C/ 1 sec	40 Zyklen
Annealing/ Elongation	60 °C/ 20 sec	

Als Haushaltsgen, das zur relativen Quantifizierung diente (Δct , *ct=cycle threshold*), wurde GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) verwendet. Die Analyse der Daten erfolgte mit der StepOnePlus™ Software V2.1. Anschließend erfolgte die Linearisierung der Werte nach folgender Formel: $\frac{1}{2}^{\Delta ct}$. Um die n-fachen Expressionen einer Gruppe zur Kontrollgruppe (Wildtyp C57Bl/6) zu bestimmen, wurde der Mittelwert der Kontrollgruppe gleich eins gesetzt und sowohl die Werte der Kontrollgruppe, als auch die der Vergleichsgruppe hierauf normalisiert.

Rechenbeispiel:

$$\frac{1}{2}^{\Delta ct} = 1, 1.5 \text{ und } 2 \text{ (Kontrollgruppe)}$$

$$\frac{1}{2}^{\Delta ct} = 3, 4.5 \text{ und } 6 \text{ (Vergleichsgruppe)}$$

Mittelwert Kontrollgruppe: 1.5, wird nun gleich 1 gesetzt

n-fache Expressionen: 0.7, 1, 1.3 (Kontrollgruppe); 2, 3, 4 (Vergleichsgruppe)

2.8 Histologie

2.8.1 Präparation der Leber

Nach der Entnahme wurden die Lebern zunächst über Nacht in 4 %iger gepufferter Formalinlösung fixiert. Anschließend wurden die Lebern für 2 h in voll entsalztem Wasser (VE-Wasser) gelagert und danach in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert

(Inkubation jeweils für 45 min in 20 %, 40 % und 70 % Isopropanol). Die Organe wurden bis zur Einbettung in Paraffin in 70 % Isopropanol gelagert. Die Einbettung der Organe erfolgte anschließend im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf nach üblichen klinischen Standards. Am Mikrotom wurden 3 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Superfrost-Objektträgern bei 37 °C für mindestens 3 h fixiert.

2.8.2 Hämatoxilin-Eosin (HE) Färbung

Für die HE-Färbung wurden die Leberschnitte zunächst in Xylol für 13 min entparaffiniert und dann in einer absteigenden Alkoholreihe hydriert (Inkubation jeweils für 5 min in 100 %, 90 %, 70 % und 50 % Ethanol). Nach zweiminütiger Inkubation in VE-Wasser, wurden die Schnitte für 10 min in einer Hämatoxilin-Färbelösung (Meyer`s Hämalaun) eingelegt. Anschließend wurden die Schnitte für 15 min in fließendem Leitungswasser gebläut und für 5 min in einer Eosin-Färbelösung inkubiert. Nach erneuten Waschen für 1 min in VE-Wasser, wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (je 30 sec in 50 % und 70 % Ethanol, 1 min in 90 % Ethanol und 2x 2 min in 100 % Ethanol). Danach wurden die Schnitte mindestens 6 min in Xylol inkubiert bis sie mit Eindeckmedium (Eukitt) eingedeckt wurden.

2.8.3 Modifizierter histologischer Aktivitätsindex (mHAI)

Die histologische Bestimmung des Entzündungsgrades der Leber erfolgte mittels der HE-gefärbten Leberschnitte nach dem mHAI²⁶⁸. Dr. A. Quaas (Facharzt für Pathologie) im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf führte hierbei verblindet die histologische Beurteilung durch. Der mHAI berücksichtigt das Ausmaß der Leberentzündung und setzt sich aus der Beurteilung der periportalen und periseptalen Interface Hepatitis (0-4), konfluenter Nekrosen (0-6), Einzelzelluntergängen (0-4) und portaler Entzündung (0-4) zusammen. Die maximal erreichbare Punktzahl beträgt somit 18.

2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism6. Für den Vergleich zweier Gruppen wurde der ungepaarte nichtparametrische Mann Whitney Test angewendet. Wurden mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen, so wurde die Einweg-ANOVA mit anschließendem post-Test (Turkeys) verwendet. Die ermittelten Signifikanzen wurden als p-Werte angegeben mit folgender Abstufung der Signifikanzniveaus: $p \leq 0.0001$ (****), $p \leq 0.001$ (***), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.05$ (*). Alle graphisch dargestellten Werte wurden als Mediane bzw. Mittelwerte +/- Standardabweichung (SEM) angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Einflusses von IL-10 bei Leberentzündungen

3.1.1 Induktion einer Leberentzündung in Abwesenheit von IL-10

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass IL-10ko Mäuse auf dem C57Bl/6 Hintergrund nach intraperitonealer Immunisierung mit dem Autoantigen der AIH SepSecS und dem Adjuvans CFA (SepSecS/CFA) eine Hepatitis entwickeln²⁶⁴. Zur Untersuchung des Einflusses von IL-10 auf die Leberentzündung wurden IL-10ko und Wildtyp C57Bl/6 Mäuse im Abstand von drei Wochen jeweils mit SepSecS/CFA immunisiert und zehn Tage nach der letzten Immunisierung die Lebern entnommen. Um den Einfluss von SepSecS-spezifischen Zellen auf die Hepatitis genauer analysieren zu können, wurden IL-10ko und Wildtyp C57Bl/6 Mäuse außerdem Autoantigen-unspezifisch mit CFA in PBS (PBS/CFA) immunisiert und auf das Auftreten einer Leberentzündung hin analysiert. Zur Untersuchung der Leberhistologien wurden Paraffinschnitte angefertigt und mit HE gefärbt (Abbildung 1). Im Gegensatz zu Wildtyp C57Bl/6 Mäusen, die keine histologisch erkennbare Hepatitis generierten (Abbildung 1A, B), waren in den Lebern der mit SepSecS/CFA und PBS/CFA immunisierten IL-10ko Mäuse deutliche Entzündungen mit portalen, periportalen und lobulären Infiltraten auszumachen (Abbildung 1C,D). Um auszuschließen, dass die IL-10ko Mäuse *per se*, d.h. auch ohne vorhergehende Immunisierung, eine Hepatitis generieren und diese womöglich durch die Immunisierung lediglich verstärkt wird, wurden die Lebern unbehandelter Mäuse ebenfalls histologisch untersucht. Eine Entzündung und die damit einhergehende Infiltration von Entzündungszellen konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 1E).

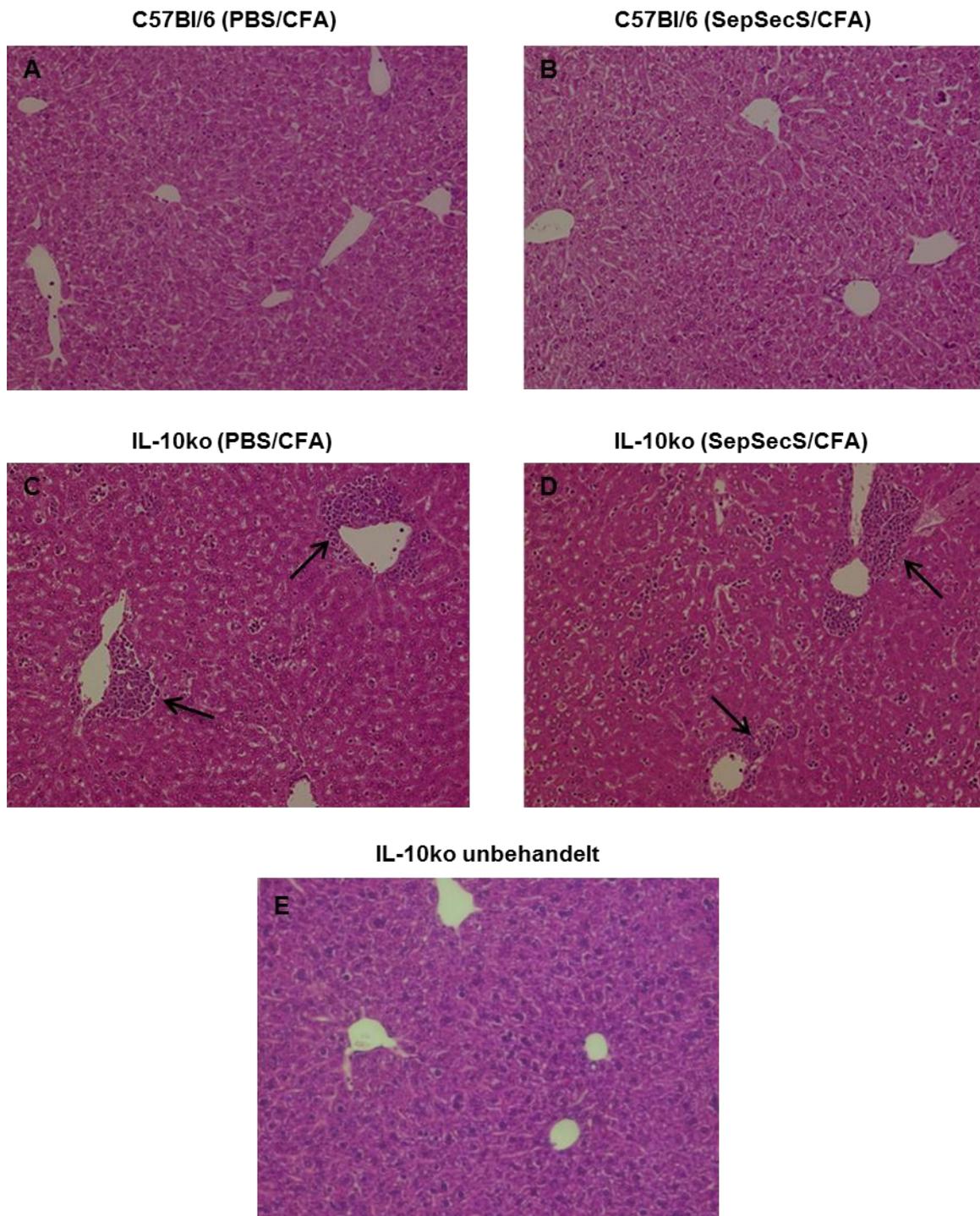


Abbildung 1: Leberhistologien von IL-10ko und C57Bl/6 Mäusen

(A-E) Gezeigt sind repräsentative HE gefärbte Leberschnitte von Wildtyp C57Bl/6 und IL-10ko Mäusen in 20facher Vergrößerung (A-D) Wildtyp C57Bl/6 und IL-10ko Mäuse wurden im Abstand von drei Wochen zweimal intraperitoneal mit einem Gemisch aus rekombinantem SepSecS Protein (10 µg) in CFA (SepSecS/CFA) oder CFA in PBS (PBS/CFA) immunisiert. Die abgebildeten Pfeile verweisen auf leukozytäre Infiltrate. (E) Leberschnitte unbehandelter IL-10ko Mäuse.

Um den Einfluss von IL-10 auf die Generierung einer Hepatitis weiter zu verifizieren, wurden C57Bl/6 Mäuse mit einem Antikörper gegen den IL-10 Rezeptor (anti-IL-10R) behandelt. Dies führt dazu, dass Zellen nicht mehr auf vorhandenes IL-10 reagieren können. Übereinstimmend zu den Ergebnissen in den IL-10ko Mäusen trat erwartungsgemäß auch hier eine deutliche Entzündung der Leber mit portalen, periportal und lobulären Infiltraten nach Immunisierung mit SepSecS/CFA und PBS/CFA auf (Abbildung 2).

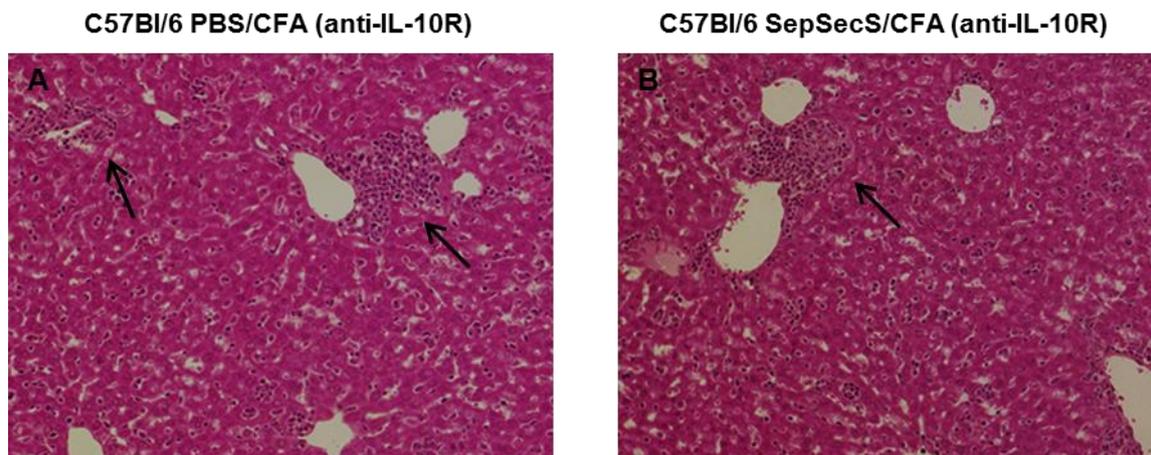


Abbildung 2: : Leberhistologien immunisierter anti-IL-10R behandelter Wildtyp C57Bl/6 Mäuse

(A,B) Gezeigt sind repräsentative HE gefärbte Leberschnitte von IL 10R Antikörper-behandelten Wildtyp C57Bl/6 in 20facher Vergrößerung. Wildtyp C57Bl/6 Mäuse wurden wöchentlich mit einem Antikörper gegen den IL 10 R (anti IL 10R, 150 µg/Maus) behandelt und im Abstand von drei Wochen zweimal intraperitoneal mit 100 µL einer Emulsion aus rekombinantem SepSecS Protein (10 µg) in CFA (SepSecS/CFA) oder CFA in PBS (PBS/CFA) immunisiert. Die abgebildeten Pfeile verweisen auf leukozytäre Infiltrate.

Zur detaillierten Einordnung der Entzündungsaktivität der Hepatitiden wurden die Leberschnitte der immunisierten IL-10ko, Wildtyp C57Bl/6 behandelt mit dem anti-IL-10R und Wildtyp C57Bl/6 von einem Pathologen (Dr. A. Quaas, Institut für Pathologie, UKE) verblindet begutachtet und mit Hilfe des modifizierten histologischen Aktivitätsindex (mHAI) beurteilt. Die Leberentzündung nach Immunisierung mit SepSecS/CFA und PBS/CFA sowohl in den IL-10ko als auch in den antikörperbehandelten C57Bl/6 Mäusen wurden mit einem medianen mHAI von 8 eingestuft, während Wildtyp C57Bl/6 lediglich einen medianen mHAI von 2.5 aufwies (Abbildung 3,***p<0.0001). Diese Ergebnisse bestätigen, dass in Abwesenheit von IL-10 eine signifikant erhöhte Entzündungsrate der Lebern generiert wird.

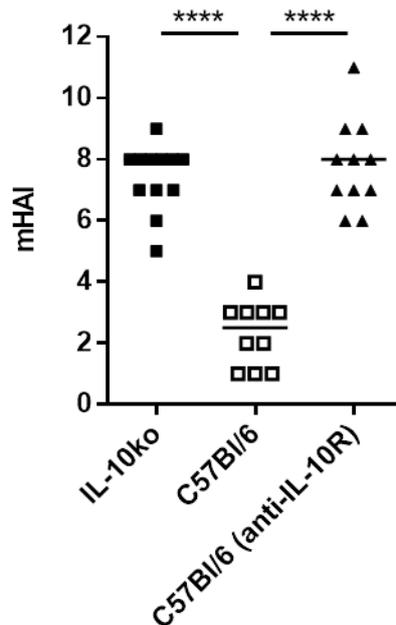


Abbildung 3: mHAI-Score der Leberentzündungen in den untersuchten Versuchsgruppen

mHAI-Score der Leberentzündungen immunisierter Wildtyp C57Bl/6, IL-10ko und immunisierter anti-IL-10R behandelter C57Bl/6 Mäuse. **** $p < 0.0001$

Im Gegensatz zu Wildtyp C57Bl/6 Mäusen zeigten sowohl IL-10ko Mäuse als auch Wildtyp Mäuse, die mit einem Antikörper gegen den IL-10 Rezeptor behandelt wurden, nach Immunisierung eine Leberentzündung mit erkennbaren portalen, periportalen und lobulären Infiltraten. Zur Charakterisierung der entzündlichen Infiltrate in den Lebern der IL-10ko Mäuse, wurden mononukleäre Zellen sowohl aus den Lebern der Wildtyp C57Bl/6 als auch aus den IL-10ko Mäusen isoliert. Der Anteil an Leukozyten wurde durchflusszytometrisch mittels des Leukozytenmarkers CD45 bestimmt, der bei Mäusen mit dem C57Bl/6 Hintergrund als CD45.2 Isoform vorliegt. Die Lebern der IL-10ko Mäuse enthielten erwartungsgemäß eine signifikant höhere Zahl an Leukozyten (1.6×10^7 Zellen pro Gramm Lebergewebe) im Vergleich zu Wildtyp C57Bl/6 Mäusen (9.7×10^5 Zellen pro Gramm Leber (Abbildung 4A, ** $p = 0.0015$)). Auch hierbei konnte kein Unterschied zwischen den mit dem Autoantigen SepSecS in CFA immunisierten und den mit PBS/CFA immunisierten Mäusen detektiert werden. Als Kontrolle wurden ebenfalls die Leukozytenzahlen der Lebern unbehandelter IL-10ko und Wildtyp C57Bl/6 bestimmt. Hierdurch konnte nochmals bestätigt werden, dass ohne Immunisierung keine wesentliche Infiltration der Lebern mit Leukozyten in den IL-10ko Mäuse vorlag, da vergleichbar geringe Leukozytenzahlen aus IL-10ko Mäusen mit 6.4×10^5 Leukozyten pro Gramm Lebergewebe und Wildtyp C57Bl/6 Mäusen mit 5.2×10^5 Leukozyten pro Gramm Leber detektiert wurden (Abbildung 4B).

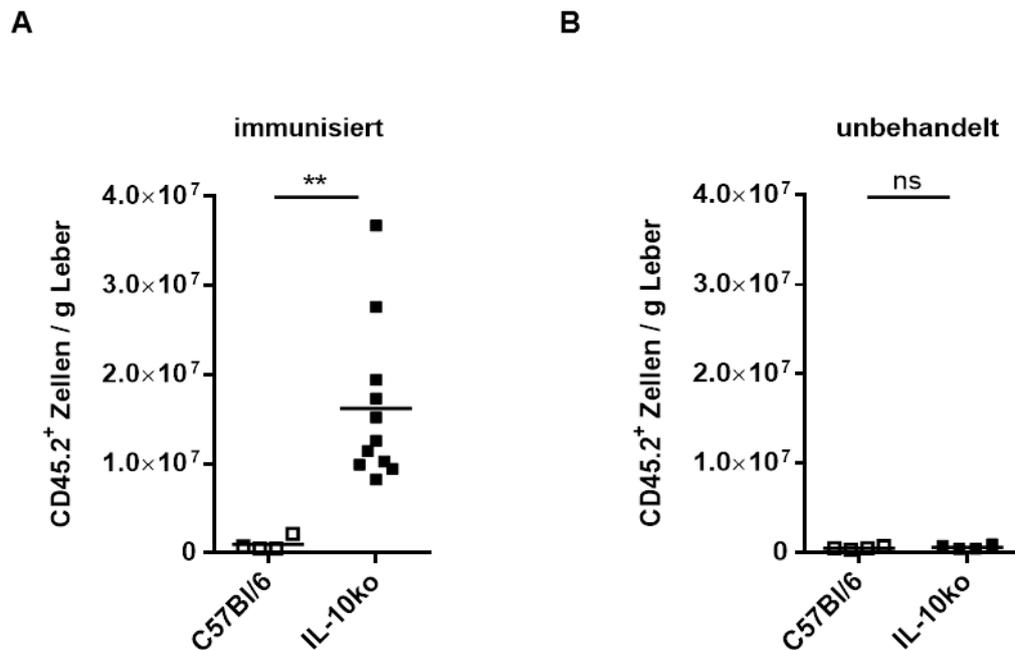


Abbildung 4: Leberleukozytenzahlen immunisierter und unbehandelter IL-10ko und Wildtyp C57Bl/6 Mäuse

Leberleukozyten (A) immunisierter und (B) unbehandelter Wildtyp C57Bl/6 und IL-10ko Mäuse wurden isoliert, mittels Durchflusszytometrie auf die Anteile CD45.2⁺ Zellen untersucht und die prozentualen Anteile auf die Zellzahl pro Gramm Leber extrapoliert. **p<0.01

3.1.2 Zusammensetzung der intrahepatischen Zellinfiltrate in IL-10-defizienten Mäusen

In den IL-10ko Mäusen konnte nach Immunisierung sowohl mit SepSecS/CFA als auch mit PBS/CFA eine Hepatitis induziert werden. Weder im Grad der Entzündung noch in der Anzahl der intrahepatischen CD45.2⁺ Zellen zeigten sich signifikante Unterschiede. Um zu analysieren, ob SepSecS die Art der Immunreaktion in den Lebern der IL-10ko Mäuse beeinflusst und somit in den beiden Versuchsgruppen unterschiedliche Zellpopulationen zur Entzündung in der Leber beitragen, wurde die Zellzusammensetzung der Infiltrate untersucht. Hierzu wurden mononukleäre Zellen nach Immunisierung mit SepSecS/CFA oder PBS/CFA aus den Lebern der IL-10ko Mäuse isoliert und mittels Durchflusszytometrie auf ihre prozentualen Anteile an B-Zellen (B220⁺ Lymphozyten), Makrophagen (F4/80⁺ Zellen), Neutrophilen Granulozyten (CD11b⁺Ly6G^{high} Zellen) und T-Zellen (CD3⁺ Lymphozyten) analysiert. Hierbei zeigte sich kein Unterschied in den prozentualen Verhältnissen der untersuchten Zellpopulationen (Abbildung 5). Die Anteile an T-Zellen (27,5 % versus 28,1 %), B-Zellen (9,5 % versus 8,5 %), Makrophagen (18,2 % versus 19,2 %) und Neutrophilen (35,9 % versus 38,1 %) waren in den Lebern der IL-10ko Mäuse nach Immunisierung mit SepSecS/CFA oder PBS/CFA jeweils in gleichem Maße vorhanden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Infiltration verschiedener Zellpopulationen in die

Leber allein auf den fehlenden Einfluss von IL-10 zurückzuführen war, die Antigen-spezifität der infiltrierenden Zellen allerdings nicht relevant zu sein scheint.

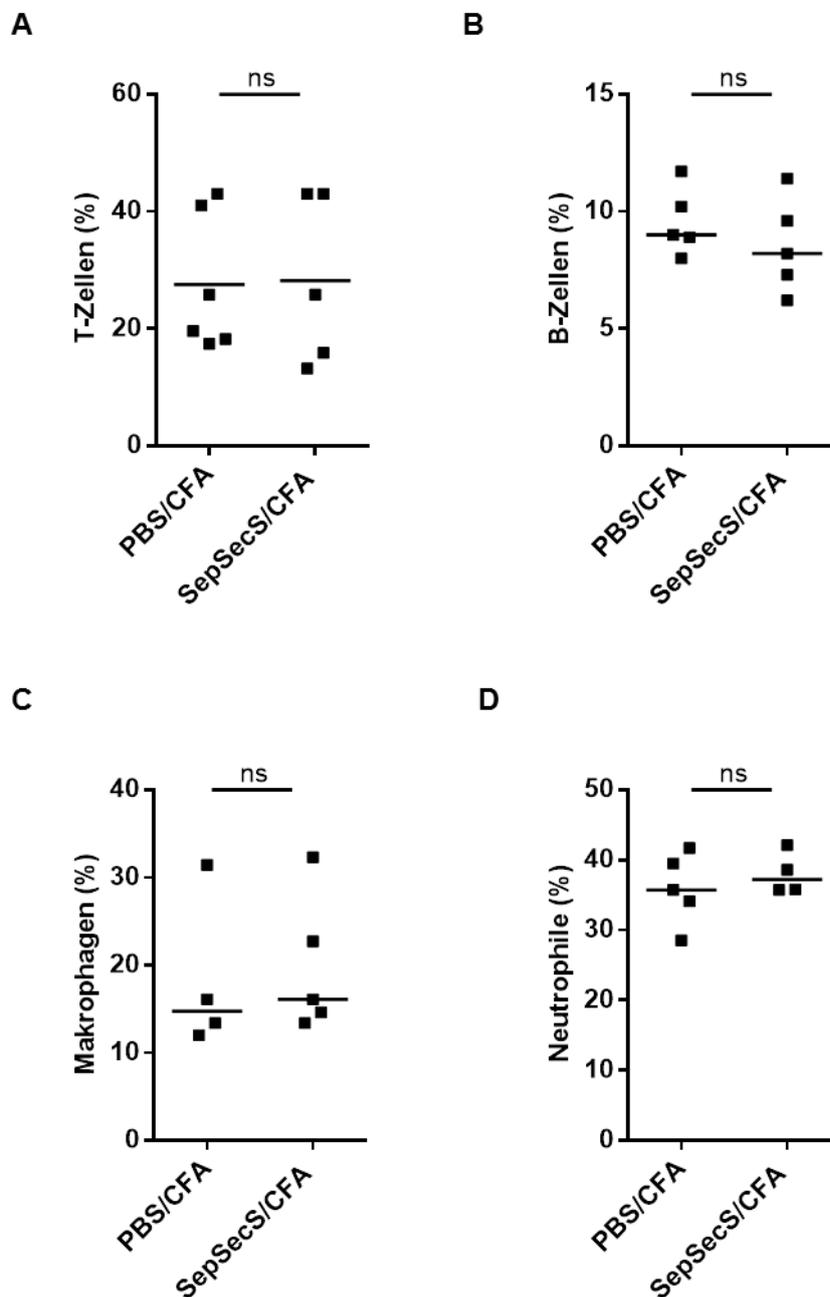


Abbildung 5: Prozentuale Verteilung von T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und Neutrophilen in den Lebern immunisierter IL-10ko Mäuse

IL-10ko Mäuse wurden intraperitoneal mit einem Gemisch aus rekombinantem SepSecS Protein (10 μ g) in CFA (SepSecS/CFA) oder PBS in CFA (PBS/CFA) immunisiert, die Leberleukozyten isoliert und durchflusszytometrisch die prozentualen Anteile an (A) T-Zellen ($CD3^+$), (B) B-Zellen ($B220^+$), (C) Makrophagen ($F4/80^+$) und Neutrophilen ($CD11b^+Ly6G^{high}$) nachgewiesen.

3.1.3 Verstärkte hepatische Rekrutierung von T-Zellen in IL-10-defizienten Mäusen

Um zu untersuchen, warum das Fehlen von IL-10-Signalen zu verstärkter Leberinfiltration von Lymphozyten führt, stand im nächsten Abschnitt zunächst die Untersuchung der Rekrutierung von T-Zellen in die entzündeten Lebern im Vergleich zum Wildtyp C57Bl/6 im Fokus. Zur Analyse der T-Zellzahl in den Lebern immunisierter IL-10ko bzw. C57Bl/6 Mäuse, wurden mononukleäre intrahepatische Zellen isoliert und durchflusszytometrisch auf die Zahl an Gesamt-T-Zellen ($CD3^+$ Lymphozyten) sowie den $CD4^+$ T-Zellen als auch $CD8^+$ T-Zellen untersucht. Soweit im Folgenden nicht explizit darauf verwiesen wird, wurden in den mit SepSecS/CFA oder PBS/CFA immunisierten Mäusen keine Unterschiede gefunden. In den Lebern der IL-10ko Mäuse waren im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen signifikant erhöhte T-Zellzahlen nachweisbar (3.9×10^6 versus 4.9×10^5 , $*p=0.0159$, Abbildung 6A). Zudem konnten in den Lebern der IL-10ko Mäuse mehr als doppelt so viele $CD8^+$ T-Zellen detektiert werden im Vergleich zum Wildtyp C57Bl/6 (1.7×10^5 versus 6.6×10^4 , $**p=0.0095$, Abbildung 6C), bei den $CD4^+$ T-Zellen waren es sogar elfmal mehr (6.0×10^5 versus 5.3×10^4 , $**p=0.0022$, Abbildung 6B).

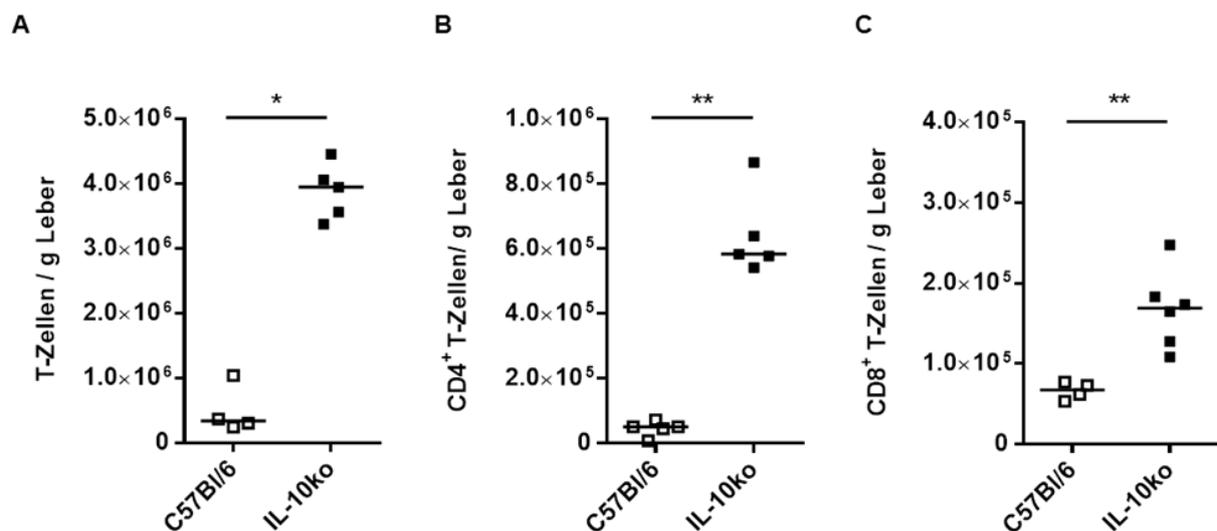


Abbildung 6: Anzahl der T-Zellen in den Lebern immunisierter IL-10ko und Wildtyp C57Bl/6 Mäusen

Leberleukozyten immunisierter Wildtyp C57Bl/6 und IL-10ko Mäuse wurden isoliert und mittels Durchflusszytometrie auf die Anteile an (A) Gesamt-T-Zellen ($CD3^+$) und den Subpopulationen der (B) $CD4^+$ bzw. (C) $CD8^+$ T-Zellen untersucht und die prozentualen Anteile auf die Zellzahl pro Gramm Leber extrapoliert. $*p<0.05$, $**p<0.01$

Für die Rekrutierung von T-Zellen in die Leber sind sowohl die Oberflächenexpression von Chemokinrezeptoren auf den Zielzellen als auch ein begünstigendes Chemokinmilieu essentiell (s. Abschnitt 1.2). Daher sollte untersucht werden, ob IL-10-Defizienz zu einem veränderten Chemokinmilieu in der Leber führte. Mittels quantitativer Real-Time PCR wurden die Expressionsmuster ausgewählter Chemokine und entsprechender Chemokinrezeptoren

in Lebergewebslysaten analysiert. Aufgrund seiner zuvor bestätigten quantitativ konsistenten Expression in Leberlysaten immunisierter IL-10ko und Wildtyp C57Bl/6 Mäuse eignete sich GAPDH ideal als Referenzgen. Sowohl der Chemokinrezeptor CXCR-3, der von aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in hohen Mengen exprimiert wird^{269,270}, wie auch seine Liganden CXCL-9, CXCL-10 und CXCL-11 zeigten sich in Abwesenheit von IL-10 signifikant erhöht (Abbildung 7A-D). Außerdem war die Expression von CCR-5, das unter anderem auf T_H1 Zellen zu finden ist, in den IL-10ko Lebern signifikant gesteigert (Abbildung 7E). Interessanterweise wurden auch CCR-6 und CCL-20 vergleichend zum Wildtyp C57Bl/6 in erhöhtem Maße exprimiert, was auf eine gesteigerte Rekrutierung von T_H17 Zellen hindeutet (Abbildung 7F,G).

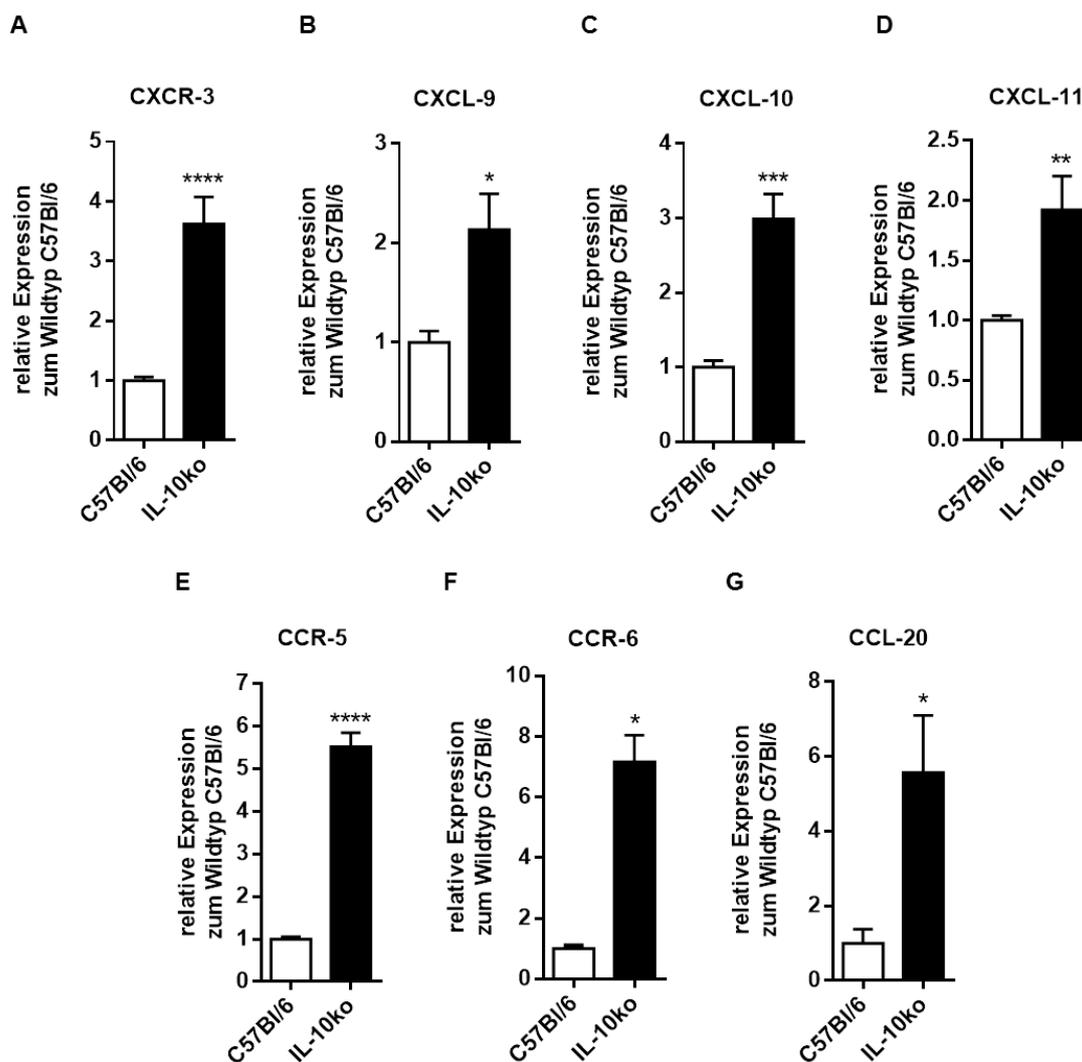


Abbildung 7: Expression von Chemokinrezeptoren und -liganden in den Lebern immunisierter IL-10ko und Wildtyp C57Bl/6 Mäuse

In den Lebern immunisierter IL-10ko und Wildtyp C57Bl/6 Mäusen wurde mittels quantitativer Real-Time PCR die Expressionen von (A) CXCR-3, (B) CXCL-9, (C) CXCL-10, (D) CXCL-11, (E) CCR-5, (F) CCR-6 und (G) CCL-20 ermittelt. Es wurden die relative Expression zum Haushaltsgen GAPDH bestimmt. Dargestellt sind die ermittelten Expressionsraten relativ zur Expression im Wildtyp C57Bl/6. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001

Diese Daten stehen im Einklang mit den nachweislich erhöhten T-Zellzahlen in den IL-10ko Mäusen, insbesondere mit der erhöhten CD4⁺ T-Zellzahl. Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass in der Leber in Abwesenheit von IL-10 vermehrt Chemokine exprimiert wurden, welche die Rekrutierung von T-Zellen in die Leber begünstigen.

3.1.4 Funktionelle Charakterisierung leberinfiltrierender T-Zellen

Um zu verstehen, welche T-Zellen bei fehlender IL-10 Signalgebung in die Lebern migriert sind, wurde zunächst die Zytokinproduktion intrahepatischer Leukozyten aus IL-10ko und Wildtyp Mäusen nach Antigen-unspezifischer Stimulation in einem vorangegangenen *Cytokine-Bead-Array* in unserer Arbeitsgruppe gemessen. Hierbei zeigte sich der größte Unterschied in der Sekretion der Zytokine IFN γ , IL-17 und GM-CSF (Daten nicht gezeigt). Zur weiteren Analyse der Effektorantworten rekrutierter T-Zellen, wurden daher mononukleäre Zellen aus den Lebern immunisierter IL-10ko und Wildtyp C57Bl/6 Mäusen isoliert, 24 h T-Zell-spezifisch mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 restimuliert und die Zytokinsekretion von IFN γ , IL-17 und GM-CSF in den Überständen mittels ELISA untersucht. Es zeigte sich, dass die T-Zellen aus IL-10ko Mäusen im Vergleich zum Wildtyp C57Bl/6 signifikant erhöhte Mengen an IFN γ (6887 pg/mL versus 1972 pg/mL, **p=0.0043), IL-17 (764 pg/mL versus 144 pg/mL, ***p=0.0005) und GM-CSF (653 pg/mL versus 43 pg/mL, **p=0.0028) in den Überstand sezernierten (Abbildung 8).

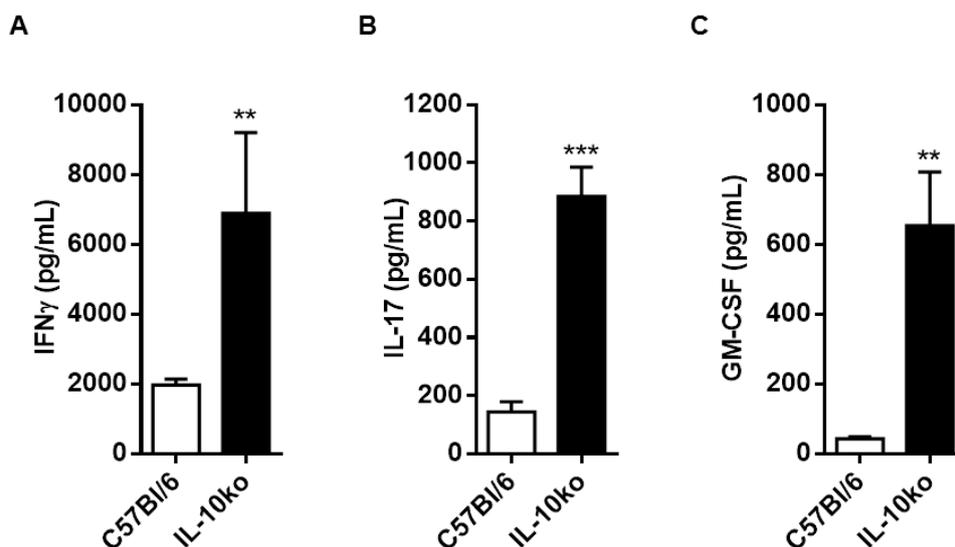


Abbildung 8: Zytokinprofil intrahepatischer T-Zellen

5×10^5 Leberleukozyten immunisierter IL-10ko und C57Bl/6 wurden mit einem Antikörper gegen CD3 (3 μ g/mL) und CD28 (3 μ g/mL) für 24 h bei 37°C restimuliert und die Sekretion der Zytokine (A) IFN γ , (B) IL-17 und (C) GM-CSF im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. **p<0.01, ***p<0.001

3.1.5 Verstärkte T-Zell-Effektorantworten in den Lebern IL-10 defizienter Mäuse

Um die Quelle der erhöhten IFN γ , IL-17 und GM-CSF Ausschüttung zu identifizieren, wurden isolierte Leberlymphozyten mit PMA/Ionomycin restimuliert und sowohl eine Oberflächenfärbung als auch eine intrazelluläre Zytokinfärbung durchgeführt. Dabei wurde in IL-10ko eine signifikant erhöhte Zahl IFN γ -produzierender CD8 $^+$ T-Zellen festgestellt. Während 74.6 % der intrahepatischen CD8 $^+$ T-Zellen aus den IL-10ko Mäusen IFN γ produzieren, waren in Wildtyp C57Bl/6 Mäusen lediglich 10.1 % CD8 $^+$ IFN γ -Produzenten nachweisbar (Abbildung 9A, **p=0.0012). IL-17-produzierende CD8 $^+$ T-Zellen waren hingegen in sehr geringem Maße vorhanden. Hier waren keine Unterschiede in den beiden Versuchsgruppen detektierbar (2.3 % versus 1.4 %, Abbildung 9B).

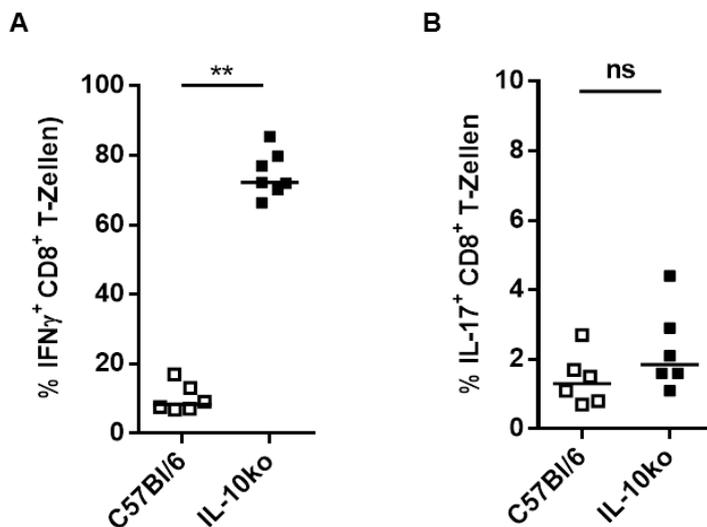


Abbildung 9: Quantitative Auswertung der IL-17 und IFN γ positiven intrahepatischen CD8 $^+$ T-Zellen

Leberlymphozyten aus IL-10ko und Wildtyp C57Bl/6 Mäusen wurden für 4 h mit PMA/Ionomycin restimuliert bei 37 °C und durchflusszytometrisch die prozentualen Anteile der (A) IFN γ^+ und (B) IL-17 $^+$ CD8 $^+$ T-Zellen bestimmt.

Zudem konnten signifikante Unterschiede in den prozentualen Anteilen IFN γ^+ CD4 $^+$ T-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 10A, ***p=0.0007). In Abbildung 10D sind repräsentative Dotplots der IL-17 und IFN γ Färbungen der CD4 $^+$ T-Zellen aus den IL-10ko und Wildtyp C57Bl/6 Mäusen dargestellt. Während in den C57Bl/6 Wildtypen lediglich 3.7 % der CD4 $^+$ T-Zellen IFN γ produzierten, waren es in den Lebern der IL-10ko Mäuse 58.8 %. Zudem waren in den Lebern der IL-10ko Mäuse signifikant mehr T $_H$ 17 Zellen detektierbar (Abbildung 10B, ***p=0.0007). Nach Stimulation zeigten 23.9 % der CD4 $^+$ T-Zellen in den IL-10ko Mäusen den T $_H$ 17 Phänotyp durch intrazelluläre Detektion von IL-17, in den Wildtyp C57Bl/6 Mäusen waren es mit 0.2 % bedeutend weniger. Interessanterweise koexprimierten 15.4 % der CD4 $^+$ T-Zellen aus den IL-10ko Mäusen IFN γ und IL-17. In den Wildtypen C57Bl/6 lag

der Anteil dieser Zellen lediglich bei 0.1 % und war somit signifikant geringer (Abbildung 10C, **p=0.0012).

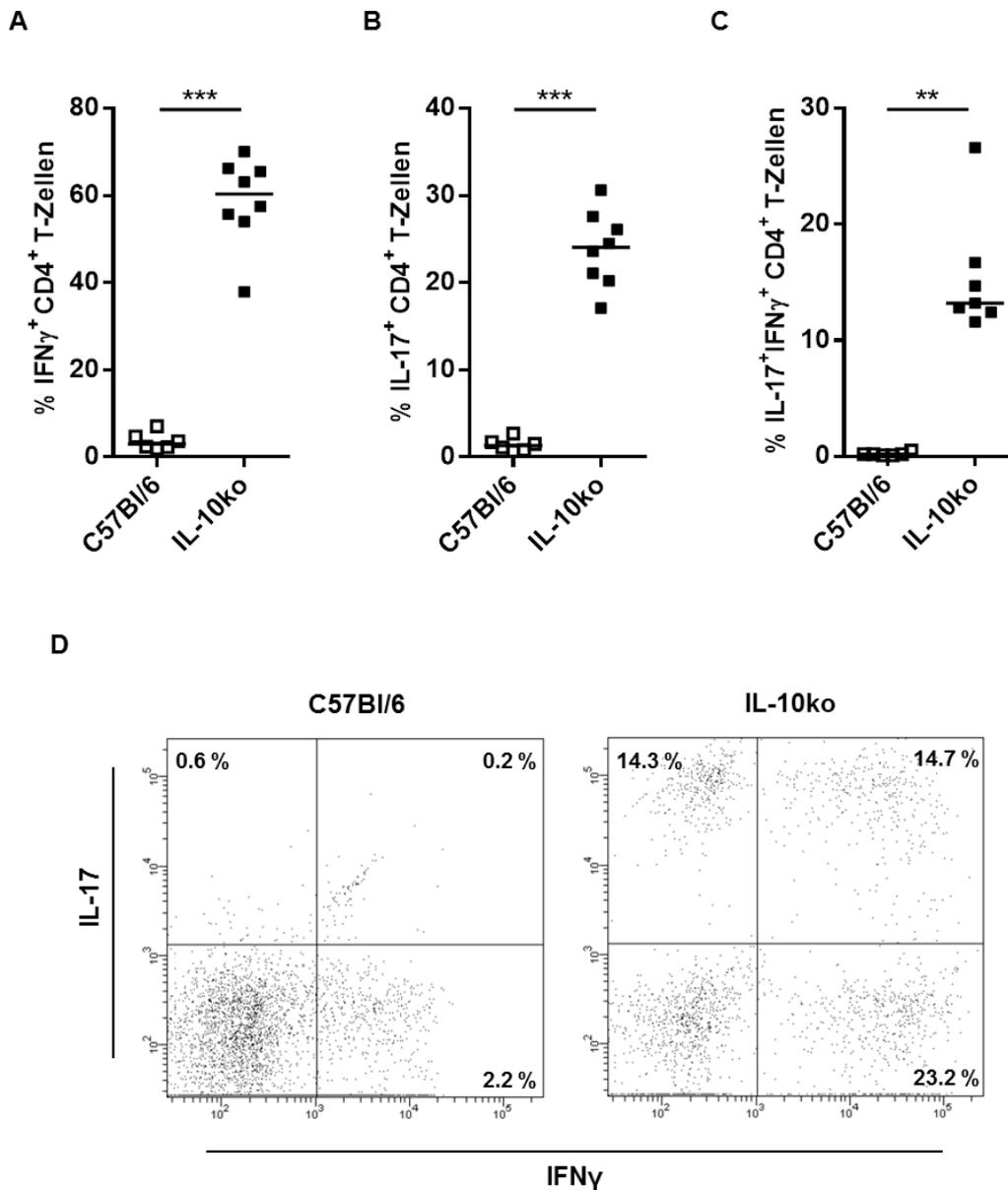


Abbildung 10: Quantitative Auswertung der IL-17 und IFN γ positiven CD4⁺ T-Zellen

Leberlymphozyten aus IL-10ko und Wildtyp C57Bl/6 Mäusen wurden für 4 h mit PMA/Ionomycin restimuliert und durchflusszytometrisch die prozentualen Anteile der (A) IFN γ ⁺, (B) IL-17⁺ und (C) IL-17⁺IFN γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen bestimmt. **p<0.01, ***p<0.001 (D) repräsentative Dotplots der IL-17 und IFN γ positiven CD4⁺ T-Zellen.

Der Nachweis des Zytokins GM-CSF war nicht möglich. Dies könnte sowohl an den Stimulationsbedingungen als auch an dem für die durchflusszytometrischen Messungen verwendeten Antikörper gelegen haben. Zudem wird GM-CSF als glykosyliertes Protein sezerniert und kann somit in der Zelle vermutlich nicht in dieser Form nachgewiesen werden²⁷¹.

T_H1 Zellen sind charakterisiert durch die vornehmliche Expression des Transkriptionsfaktors Tbet, T_H17 Zellen hingegen durch die Expression von ROR γ t. Daher wurden in quantitativen Real-Time PCR-Studien in Lebergewebslysaten aus immunisierten IL-10ko und Wildtyp C57Bl/6 Mäusen die Expression von Tbet und ROR γ t überprüft. Es zeigte sich, dass ROR γ t verstärkt in den Lebern der IL-10ko Mäuse exprimiert wurde (Abbildung 11A, **p=0.0079) und auch Tbet konnte mit einer bis zu 8fach erhöhten Expression detektiert werden (Abbildung 11B, ***p<0.001).

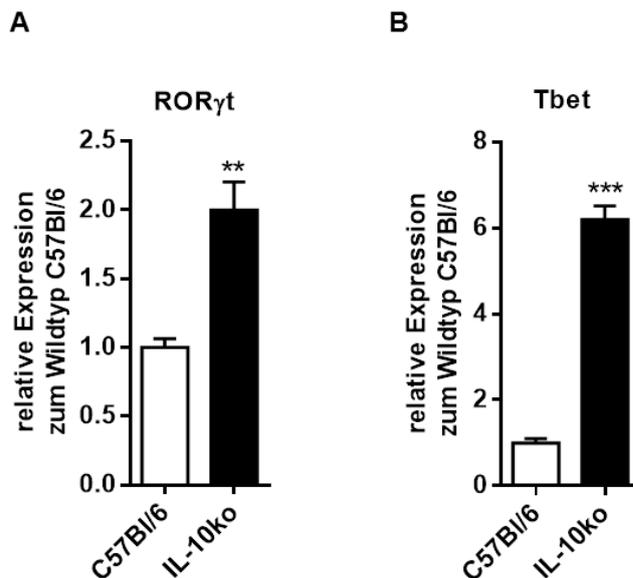


Abbildung 11: Relative Expression von ROR γ t und Tbet in den Lebern immunisierter IL-10ko und Wildtyp C57Bl/6

Aus den Lebern immunisierter IL-10ko und Wildtyp C57Bl/6 Mäuse wurde mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer Real-Time PCR die Expression von (A) ROR γ t und (B) Tbet ermittelt. Es wurde die relative Expression zum Haushaltsgen GAPDH bestimmt. Dargestellt ist die Expressionsrate relativ zur Expression im Wildtyp C57Bl/6. **p<0.01, ***p<0.001

Es wurde weiterhin untersucht, ob auch SepSecS-spezifische T-Zellen in den Lebern der IL-10ko Mäuse den T_H1 und T_H17 Phänotyp aufwiesen und ebenfalls die Zytokine IFN γ , IL-17 und GM-CSF sezernierten. Hierfür wurden CD4⁺ T-Zellen aus den Lebern der mit SepSecS/CFA oder PBS/CFA immunisierten IL-10ko Mäuse in Gegenwart autologer DCs Autoantigen-spezifisch mit SepSecS restimuliert und die Zytokinsekretion in den Zellkulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Hierbei wurde deutlich, dass auch die Autoantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen IFN γ , IL-17 und GM-CSF sezernierten (Abbildung 12). Im Vergleich zu CD4⁺ T-Zellen der PBS/CFA immunisierten IL-10ko Mäuse wurden von den SepSecS-spezifischen CD4⁺ T-Zellen signifikant mehr IFN γ (1905 pg/mL versus 456 pg/mL, **p=0.0013), IL-17 (247 pg/mL versus 16 pg/mL, ****p<0.0001) und GM-CSF (380 pg/mL versus 85 pg/mL, ****p<0.0001) in den Überstand ausgeschüttet.

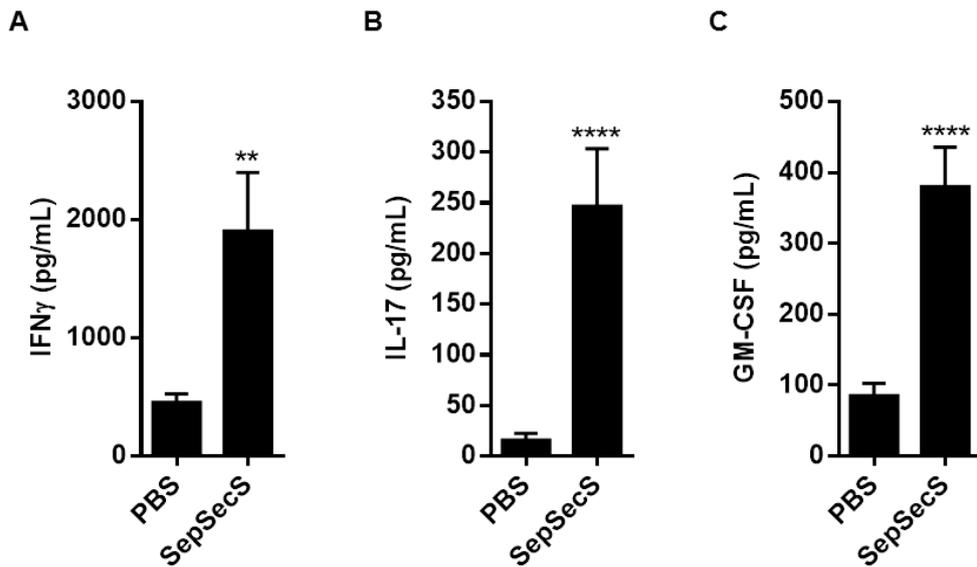


Abbildung 12: Zytokinprofil der intrahepatischen Autoantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen

2.5x10⁵ isolierte CD4⁺ T-Zellen der mit PBS/CFA (PBS) oder SepSecS/CFA (SepSecS) immunisierten IL-10ko Mäuse wurden in Gegenwart von 5x10⁴ autologer DCs mit SepSecS (4 μ g/mL) 24 h bei 37°C restimuliert und die Zytokine (A) IFN γ , (B) IL-17 und (C) GM-CSF in den Zellkulturüberständen mittels ELISA bestimmt.

3.1.6 Erhöhtes T_H17 förderndes Milieu in den Lebern von IL-10 defizienten Mäusen

In den Lebern der IL-10ko Mäuse konnten in den entzündeten Lebern vermehrt T_H17 Zellen nachgewiesen werden. Nun sollte untersucht werden, ob das Zytokinmilieu in den Lebern der IL-10ko Mäuse zum Erhalt und zur Expansion des T_H17 Phänotyps beiträgt. Hierzu wurde untersucht, ob die Zytokine TGF β , IL-6 und IL-1 β , die zur T_H17 Konversion beitragen, vermehrt in den Lebern der IL-10ko Mäuse exprimiert werden. Das Zytokin IL-23 fördert die Expansion und Aufrechterhaltung der T_H17 Zellen und war ebenfalls Gegenstand dieser Analysen^{272,273}. Zur Untersuchung des Zytokinmilieus wurde Lebergewebe immunisierter IL-10ko und Wildtyp C57Bl/6 Mäuse mittels quantitativer Real-Time PCR auf die Expression der oben genannten Zytokine analysiert. Hierbei zeigte sich, dass TGF β , IL-6, IL-1 β und IL-23 in signifikant erhöhtem Maße in Abwesenheit von IL-10 im Lebergewebe exprimiert wurden (Abbildung 13). Im Vergleich zum Wildtyp C57Bl/6 konnte in den Lebern der IL-10ko Mäuse eine doppelt so hohe Expression von TGF β (**p=0.0079) und eine bis zu viermal erhöhte Expression von IL-6 (**p=0.0079) nachgewiesen werden. Die Werte von IL-1 β zeigten sich im Mittel zweifach erhöht im Vergleich zum Wildtyp C57Bl/6 (*p=0.0317). Die hepatische IL-23 Expression in IL-10ko Mäusen war mit einer bis zu dreißigfach erhöhten Expression im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich erhöht (**p=0.0025). Dies deutet darauf hin, dass durch das vorherrschende hepatische Zytokinmilieu in den IL-10ko Mäusen sowohl die Expansion als auch der Erhalt des T_H17 Phänotyps gefördert werden kann.

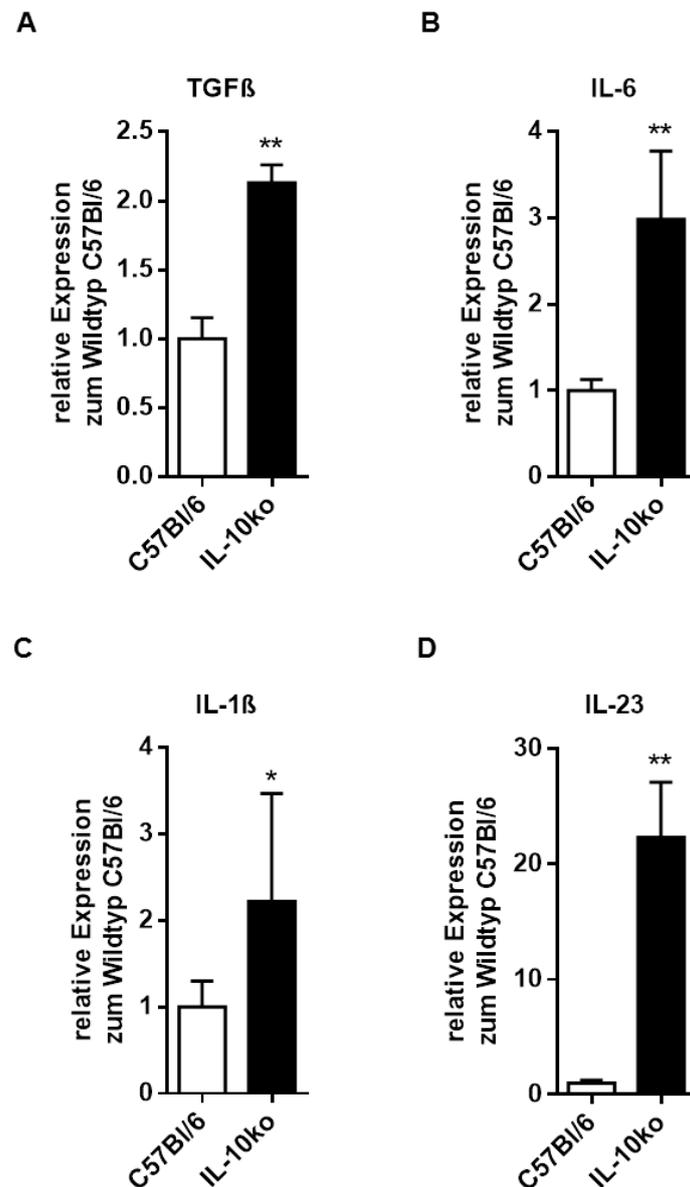


Abbildung 13: Relative Expressionen von TGFβ, IL-6, IL-1β und IL-23 in den Lebern immunisierter IL-10ko und C57Bl/6 Mäuse

Aus den Lebern immunisierter IL-10ko und Wildtyp C57Bl/6 Mäusen wurde mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer Real-Time PCR die Expression von (A) TGFβ, (B) IL-6, (C) IL-1β und (D) IL-23 ermittelt. Es wurde die relative Expression zum Haushaltsgen GAPDH bestimmt. Dargestellt sind die Expressionsraten relativ zur Expression im Wildtyp C57Bl/6. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

3.1.7 Verstärkte Aktivierung intrahepatischer CD4⁺ T-Zellen durch erhöhte Expression von MHCII und kostimulatorischen Molekülen bei IL-10-Defizienz

Die vermehrte Zytokinsekretion von IFN γ , IL-17 und GM-CSF durch intrahepatische CD4⁺ T-Zellen der IL-10ko Mäuse im Vergleich zum Wildtyp C57Bl/6 ließ auf eine verstärkte Aktivierung der T-Zellen in Abwesenheit von IL-10 schließen. Zur Analyse des Aktivierungsgrades der T-Zellen wurde untersucht, ob es zu einer erhöhten Expression von PD-1 gekommen war, das nach Aktivierung auf T-Zellen hochreguliert wird. Hierzu wurde

Lebergewebe immunisierter IL-10ko bzw. Wildtyp C57Bl/6 mittels quantitativer PCR auf die Expression von PD-1 untersucht. Im Vergleich zum Wildtyp C57Bl/6 konnte eine bis zu achtfach gesteigerte Expression von PD-1 (Abbildung 14A, $**p=0.0075$) in den Lebern der IL-10ko Mäuse nachgewiesen werden.

Zur effizienten Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen werden prinzipiell zwei Stimuli benötigt: (1) Interaktion des TCR mit einem MHCII-Peptid-Komplex und (2) Bindung von CD28 an kostimulatorische Moleküle (CD80, CD86). APC exprimieren sowohl MHCII-Moleküle wie auch die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, um T-Zellen aktivieren zu können. Daher wurde zudem untersucht, ob der erhöhte Aktivierungsstatus der T-Zellen in Abwesenheit von IL-10 mit einem erhöhten Potential der antigenpräsentierenden und kostimulierenden Eigenschaften der APCs einherging. Hierzu wurde die relative Expression von MHCII, CD80 und CD86 in den Lebern der IL-10ko und Wildtyp C57Bl/6 mittels quantitativer PCR bestimmt. Abbildung 14 zeigt die Expression dieser Moleküle relativ zur Expression im Wildtyp C57Bl/6. Hierbei konnte in den Lebern der IL-10ko Mäuse eine signifikant erhöhte Expression von MHCII (H2-Ab1, $*p=0.0159$) und CD80 ($**p=0.0079$) im Vergleich zum Wildtyp C57Bl/6 detektiert werden. Bei CD86 war dieser Unterschied gering ($p=0.2500$). Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass die erhöhte Aktivierung von T-Zellen in Abwesenheit von IL-10 auch mit einem erhöhten antigenpräsentierenden und kostimulatorischem Potenzial in der Leber korreliert.

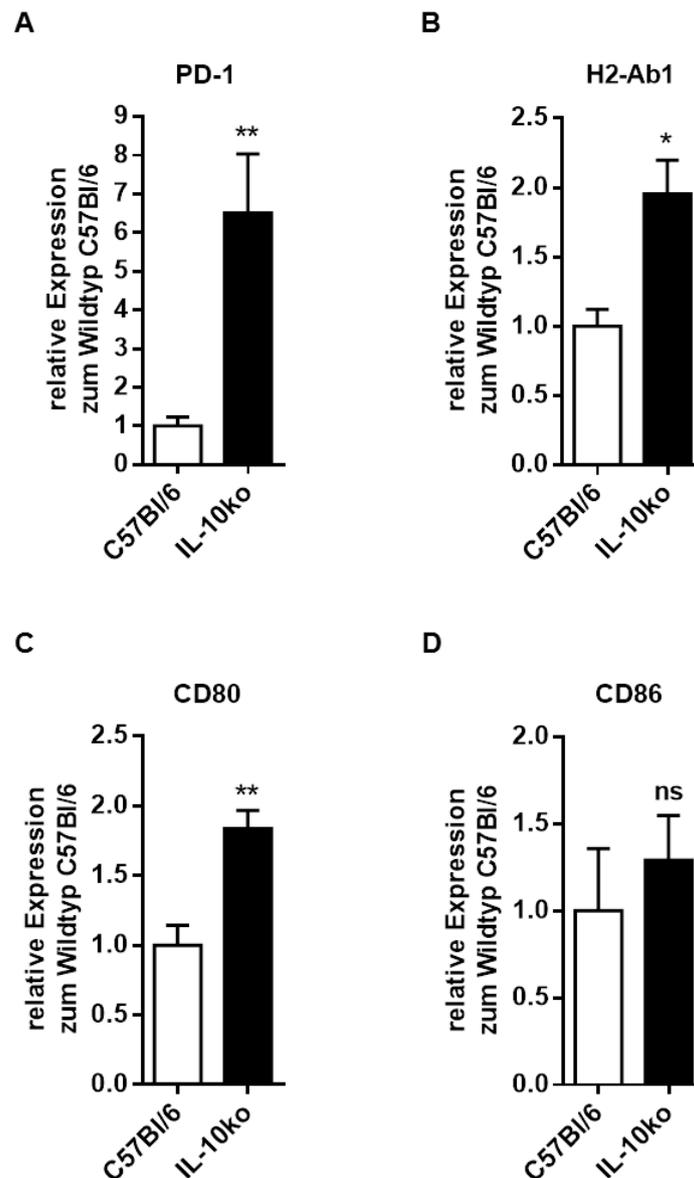


Abbildung 14: Relative Expression von PD-1, MHCII und kostimulatorischen Molekülen in den Lebern immunisierter IL-10ko und C57Bl/6 Mäuse

Aus den Lebern immunisierter IL-10ko und Wildtyp C57Bl/6 Mäusen wurde mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer PCR die Expression von (A) PD-1, (B) MHCII (H2-Ab1), (C) CD80 und (D) CD86 ermittelt. Es wurde die relative Expression zum Haushaltsgen GAPDH bestimmt. Dargestellt sind die Expressionsraten relativ zur Expression im Wildtyp C57Bl/6. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

3.2 Charakterisierung des Einflusses von IL-10 bei der T-Zelldifferenzierung

Im Vergleich zum Wildtyp C57Bl/6 waren in den IL-10ko Mäusen nach Induktion einer Hepatitis vermehrt T_H1 und T_H17 Zellen in die Lebern eingewandert. Wurden mononukleäre Zellen aus IL-10ko Mäusen isoliert und T-Zell-spezifisch restimuliert, zeigten sie im Vergleich zur Kontrolle eine verstärkte Sekretion der T_H1 und T_H17 Zytokine IFN γ , IL-17 und GM-CSF.

Die Leberentzündung schien durch die Rekrutierung Autoantigen-unspezifischer T-Zellen, insbesondere von T_H1 und T_H17 Zellen, in die Leber forciert zu sein, allerdings konnten nach Immunisierung mit SepSecS auch Autoantigen-spezifische T_H1 und T_H17 Zellen nachgewiesen werden, die ebenfalls die Zytokine IFN γ , IL-17 und GM-CSF sezernierten. Daher wurde im nächsten Abschnitt dieser Arbeit untersucht, ob die Differenzierung zu T_H1 und T_H17 Zellen bei der Initiation der Immunantwort in den Lymphknoten durch IL-10 unterbunden wird.

3.2.1 Veränderte zelluläre Zusammensetzung im Lymphknoten bei IL-10 Defizienz

In die Lebern der IL-10ko Mäuse kam es vermehrt zur Infiltration von T-Zellen im Vergleich zum Wildtyp C57Bl/6. Daher sollte zunächst untersucht werden, ob IL-10 die Expansion von T-Zellen inhibiert. Hierzu wurden IL-10ko und Wildtyp C57Bl/6 Mäuse mit SepSecS/CFA oder PBS/CFA subkutan in den Fuß immunisiert, nach zehn Tagen die drainierenden poplitealen Lymphknoten entnommen und mononukleäre Zellen isoliert. Anschließend erfolgte mittels Durchflusszytometrie die Bestimmung der absoluten Zellzahl an Gesamtlymphozyten, T-Zellen sowie der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zell-Subpopulationen in den entnommenen Lymphknoten. Soweit im Folgenden nicht explizit darauf verwiesen wird, wurden in den mit SepSecS/CFA oder PBS/CFA immunisierten Mäusen keine Unterschiede detektiert. Die Lymphknoten der IL-10ko als auch der Wildtyp C57Bl/6 wiesen eine ähnliche Anzahl an $CD45.2^+$ Lymphozyten (2.3×10^7 versus 2.2×10^7 , $p=0,8619$) und T-Zellen (1.3×10^7 versus 1.4×10^7 , $p=0,7137$) auf (Abbildung 15A, B). Jedoch waren Unterschiede in der Verteilung der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen detektierbar. In den Lymphknoten der IL-10ko Mäuse waren signifikant verringerte Zellzahlen an $CD8^+$ T-Zellen (4.0×10^6 versus 6.9×10^6 , $*p=0,0111$) nachweisbar, während verglichen mit dem Wildtyp C57Bl/6 vermehrt $CD4^+$ T-Zellen (7.4×10^6 versus 5.4×10^6 , $*p=0,0359$) zu finden waren (Abbildung 15C, D). In Abwesenheit von IL-10 expandierten $CD4^+$ T-Zellen demnach stärker als in den Wildtyp C57Bl/6 Mäusen.

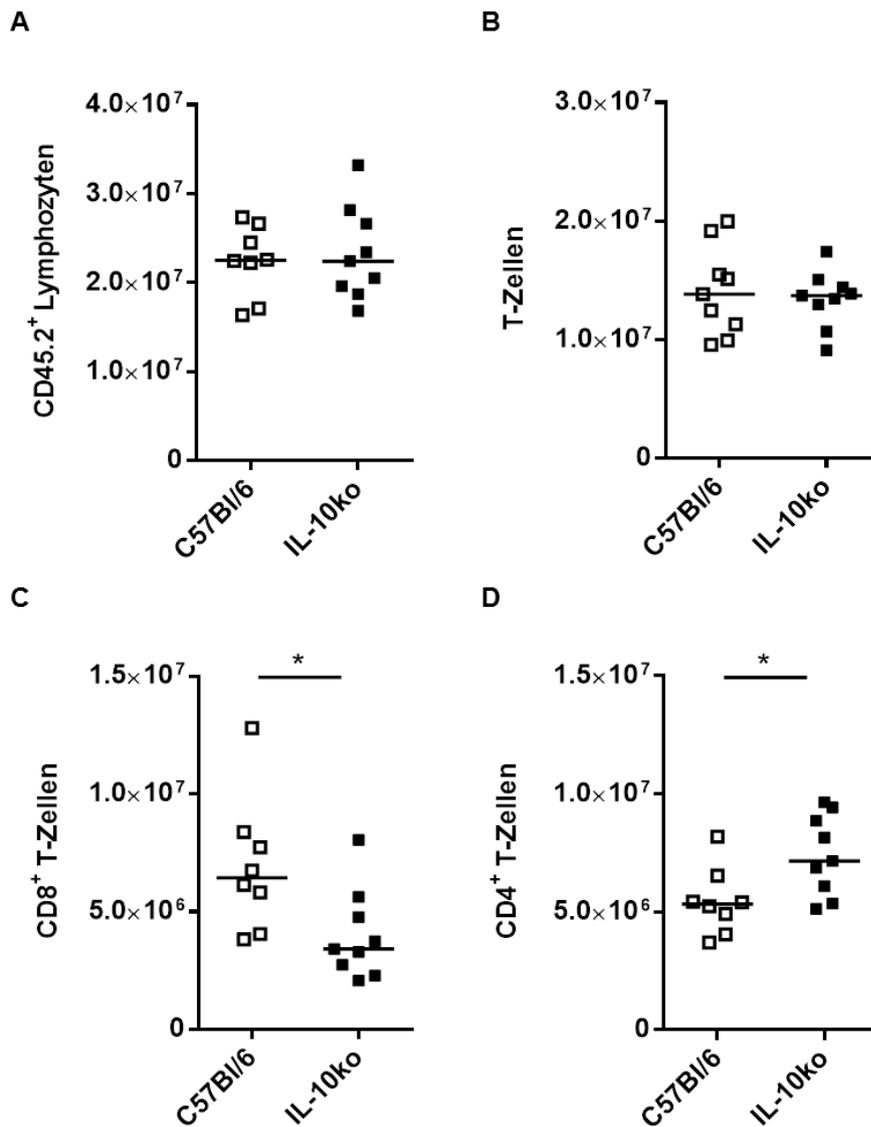


Abbildung 15: Zellzahlen der CD45.2⁺ Lymphozyten, T-Zellen (CD3⁺), CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Zellen in den Lymphknoten immunisierter IL-10ko und Wildtyp C57Bl/6 Mäuse

Die politealen Lymphknoten immunisierter IL-10ko und C57Bl/6 Mäusen wurden isoliert und die Gesamtzellzahl an (A) CD45.2⁺ Lymphozyten, (B) Gesamt-T-Zellen (CD3⁺) sowie der Subpopulationen an (C) CD8⁺ und (D) CD4⁺ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

3.2.2 Verstärkte Differenzierung zu T_H1 und T_H17 Zellen in IL-10 defizienten Mäusen

Es sollte überprüft werden, ob die Abwesenheit von IL-10 bei der initialen Immunantwort im Lymphknoten ebenso wie in den Lebern zu einer erhöhten Sekretion der Zytokine IFN γ , IL-17 und GM-CSF durch T-Zellen führt. Hierzu wurden mononukleäre Zellen zehn Tage nach Immunisierung von IL-10ko und Wildtyp C57Bl/6 Mäusen aus den drainierenden Lymphknoten isoliert, die T-Zellen mit einem Antikörper gegen CD3 für 24 h bei 37 °C restimuliert und die Zytokinsekretion in den Überständen mittels ELISA gemessen. T-Zellen der IL-10ko Mäuse sezernieren signifikant größere Mengen IFN γ (4403 pg/mL versus 507 pg/mL, ***p=0.0003), IL-17 (1022 pg/mL versus 121 pg/mL, **p=0.0043) und GM-CSF

(206 pg/mL versus 37 pg/mL, **** $p < 0.0001$) im Vergleich zu den T-Zellen der Wildtyp C57Bl/6 Mäuse (Abbildung 16).

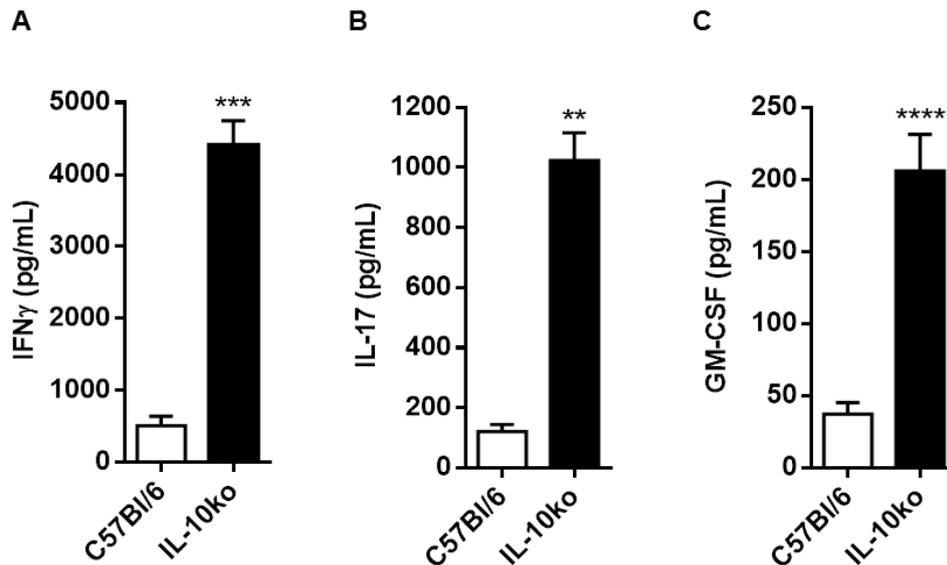


Abbildung 16: Zytokinprofil der T-Zellen bei der Initiation der Immunantwort in den Lymphknoten von IL-10ko und C57Bl/6 Mäusen

5×10^5 mononukleäre Zellen aus den Lymphknoten immunisierter IL-10ko und Wildtyp C57Bl/6 Mäuse wurden T-Zellspezifisch mit einem Antikörper gegen CD3 für 24 h bei 37 °C restimuliert und die Zytokine (A) IFN γ , (B) IL-17 und (C) GM-CSF im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

Die vermehrte Sekretion der Zytokine IFN γ , IL-17 und GM-CSF in Abwesenheit von IL-10 ließ vermuten, dass in den Lymphknoten eine erhöhte Differenzierung zu T_H1 und T_H17 Zellen stattgefunden hat. Um dies weiter zu untersuchen, wurden CD4⁺ T-Zellen aus den Lymphknoten isoliert und für 24 h mit einem Antikörper gegen CD3 restimuliert. Die Messung der Zytokinproduktion in den Überständen der isolierten CD4⁺ T-Zellen ergab, dass sowohl die Sekretion von IFN γ (1926 pg/mL versus 871 pg/mL, *** $p = 0.0003$) als auch von IL-17 (464 pg/mL versus 111 pg/mL, ** $p = 0.0043$) und GM-CSF (439 pg/mL versus 101 pg/mL, **** $p < 0.0001$) signifikant erhöht waren in den IL-10ko Mäusen (Abbildung 17).

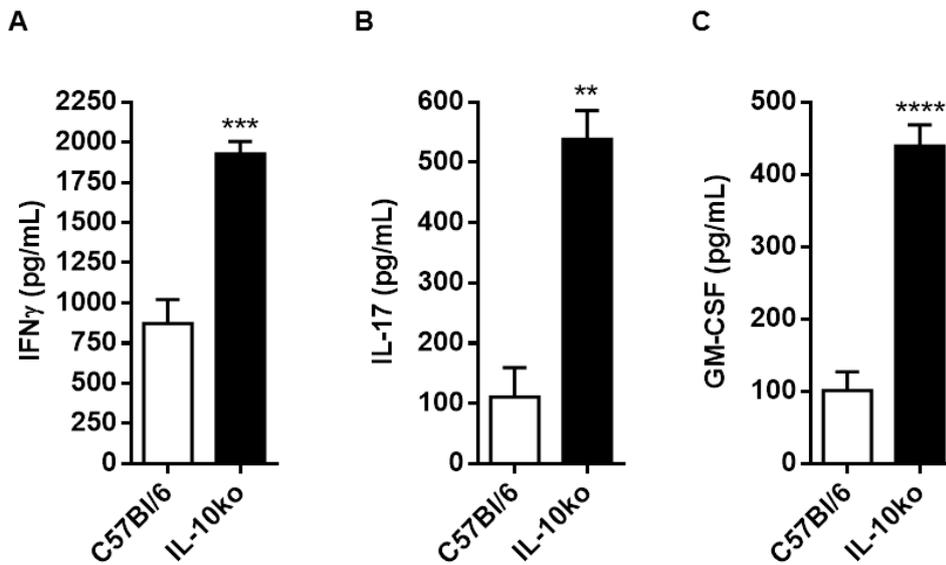


Abbildung 17: Zytokinprofil der CD4⁺ T-Zellen in den Lymphknoten immunisierter IL-10ko und C57Bl/6 Mäuse

CD4⁺ T-Zellen wurden aus den Lymphknoten immunisierter IL-10ko und C57Bl/6 Mäuse isoliert und 2.5×10^5 CD4⁺ T-Zellen mit einem Antikörper gegen CD3 für 24 h bei 37 °C restimuliert. Die Sekretion der Zytokine (A) IFN γ , (B) IL-17 und (C) GM-CSF wurden mittels ELISA im Zellkulturüberstand gemessen. **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001

In den Lebern der IL-10ko Mäuse konnten zudem vermehrt SepSecS-spezifische CD4⁺ T-Zellen des T_H1 bzw. T_H17 Phänotyps nachgewiesen werden, die ebenfalls die Zytokine IFN γ , IL-17 und GM-CSF sezernierten. Zur Analyse des Differenzierungsstatus der SepSecS-spezifischen T-Zellen wurden CD4⁺ T-Zellen aus den Lymphknoten der mit SepSecS in CFA immunisierten IL-10ko und C57Bl/6 Mäuse mit SepSecS restimuliert und die Zytokinproduktion in den Zellkulturüberständen gemessen. Hierbei zeigte sich, dass ebenfalls die Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen der IL-10ko Mäuse signifikant mehr IFN γ (1181 pg/mL versus 141 pg/mL, **p=0.0013), IL-17 (95 pg/mL versus 8 pg/mL, *p=0.0286) und GM-CSF (58 pg/mL versus 10 pg/mL, **p=0.0040) im Vergleich zum Wildtyp C57Bl/6 sezernierten (Abbildung 18).

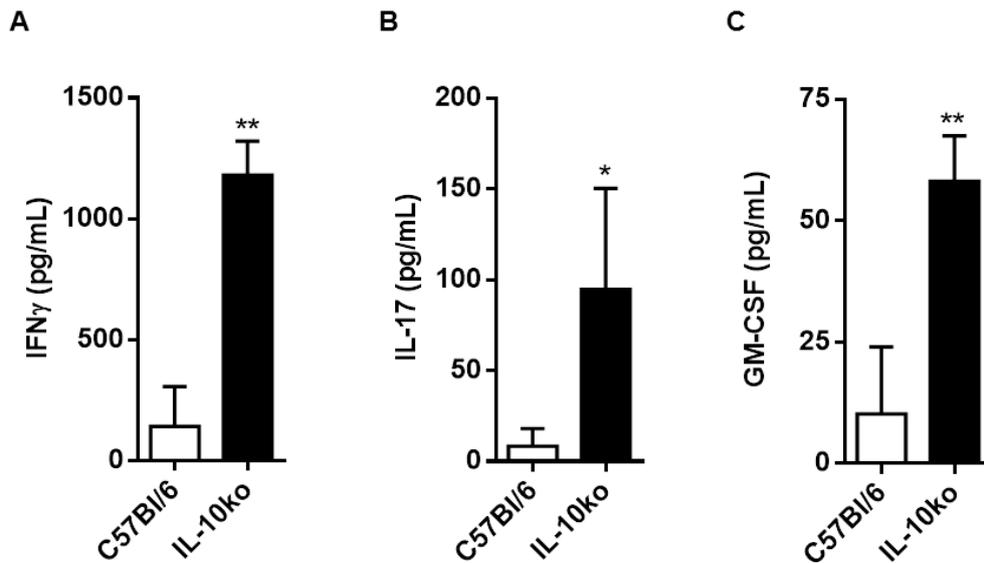


Abbildung 18: Zytokinprofil von SepSecS-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in den Lymphknoten immunisierter IL-10ko und C57Bl/6 Mäuse

2.5×10^5 CD4⁺ T-Zellen aus den Lymphknoten immunisierter IL-10ko und C57Bl/6 Mäuse wurden in Gegenwart von 5×10^4 DCs aus Wildtyp Mäusen mit SepSecS (4 $\mu\text{g/mL}$) für 24 h bei 37 °C restimuliert und die Zytokinsekretion von (A) IFN γ , (B) IL-17 und (C) GM-CSF im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

3.3 Charakterisierung des Einflusses von IL-10 im CD4dnIL-10R α -Mausmodell

Die bislang beschriebenen Experimente haben gezeigt, dass IL-10ko Mäuse nach Immunisierung mit SepSecS/CFA oder PBS/CFA eine Leberentzündung generieren, die durch portale, periportale und lobuläre zelluläre Infiltrate gekennzeichnet war. Das Fehlen des tolerogenen Zytokins IL-10 führte in der Leber zu einer verstärkten Expression inflammatorischer Chemokine und zu einer erhöhten Migration von T-Zellen in die Leber, die nach *ex vivo* Restimulation vermehrt die Effektorzytokine IFN γ , IL-17 und GM-CSF freisetzen und damit einen T_H1 und T_H17 Phänotyp aufweisen. Die verstärkte Aktivierung der T-Zellen korrelierte hierbei mit einem erhöhten antigenpräsentierenden und kostimulierenden Potential von APCs in der Leber. In den folgenden Abschnitten sollte nun untersucht werden, ob IL-10 bei Entzündungen der Leber lediglich indirekt durch die beschriebenen inhibitorischen Effekte auf APCs agiert oder auch direkt die inflammatorischen Aktivitäten von T-Zellen beeinflusst. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden CD4dnIL-10R α Mäuse verwendet, in denen die IL-10-Signalgebung spezifisch in T-Zellen blockiert ist²⁶⁶. Durch Überexpression des dominant-negativen IL-10-Rezeptor α unter der Kontrolle des CD4 Promotors sind lediglich T-Zellen unempfindlich gegenüber dem Einfluss von IL-10. Alle übrigen Zellpopulationen wie APCs bleiben jedoch weiterhin sensitiv gegenüber IL-10. Im

Folgendes wurde daher untersucht, ob CD4dnIL-10R α Mäuse nach Immunisierung ebenfalls eine Hepatitis generieren.

3.3.1 Induktion einer Leberentzündung in CD4dnIL-10R α Mäusen

Zur Untersuchung der Hepatitisgenerierung im CD4dnIL10R α Mausmodell wurden CD4dnIL10R α Mäuse mit SepSecS/CFA oder PBS/CFA im Abstand von drei Wochen zweimal immunisiert und nach zehn Tagen die Lebern entnommen. Zur Analyse der Leberhistologien wurden Paraffinschnitte angefertigt und mit HE gefärbt. Hierbei zeigte sich, dass CD4dnIL10R α Mäuse eine Leberentzündung mit periportalen und lobulären Infiltraten entwickelten, die, wie schon zuvor in IL-10ko Mäusen gezeigt (Abbildung 1C, D), unabhängig von der Autoantigen-spezifischen Immunisierung mit SepSecS/CFA oder der Autoantigen-unspezifischen Immunisierung mit PBS/CFA war (Abbildung 19A, B). Ebenfalls wurden die Lebern unbehandelter CD4dnIL10R α Mäuse histologisch untersucht, um das generelle Auftreten einer Hepatitis ohne Immunisierung auszuschließen. Die histologische Beurteilung der HE gefärbten Leberschnitte wies jedoch keine Anzeichen einer Hepatitis auf. Weder periportale noch lobuläre Infiltrate waren mikroskopisch detektierbar (Abbildung 19C). Die Leberschnitte der PBS/CFA immunisierten CD4dnIL10R α Mäuse wurden von einem Pathologen verblindet begutachtet und zur Beurteilung des Schweregrads der Leberentzündung der mHAI-Score ermittelt. Der mediane mHAI der CD4dnIL10R α Lebern nach Immunisierung betrug 5.5 (Abbildung 19E). Somit wurde die Leberentzündung der CD4dnIL10R α Mäuse schwächer eingestuft als die der IL-10ko Mäuse (medianer mHAI = 8, Abbildung 3), jedoch stärker im Vergleich mit dem Wildtyp C57Bl/6 (medianer mHAI = 2.5, Abbildung 3). Zudem wurde die Anzahl der Leukozyten vergleichend in den immunisierten und unbehandelten CD4dnIL10R α Mäusen untersucht. Mittels Durchflusszytometrie wurde der Anteil CD45.2⁺ Zellen (Leukozyten) der Lebern bestimmt und die prozentualen Anteile auf die Zellzahl pro Gramm Leber hochgerechnet. Die Analysen ergaben, dass im Vergleich mit unbehandelten Tieren (5.7×10^5 Zellen pro Gramm Leber) signifikant mehr Leukozyten in den Lebern immunisierter CD4dnIL10R α Mäuse detektierbar waren (3.9×10^6 Zellen pro Gramm Leber (Abbildung 19D, * $p=0.0159$)). Stellt man die Leukozytenzahl pro Gramm Leber von CD4dnIL10R α , IL-10ko und Wildtyp C57Bl/6 Mäusen nach Immunisierung gegenüber, so wird deutlich, dass die Lebern der CD4dnIL10R α Mäuse weitaus weniger Leukozyten aufwiesen als IL-10ko Mäuse mit 1.6×10^7 Zellen pro Gramm Leber (Abbildung 4A), jedoch mehr als Wildtyp C57Bl/6 Mäuse mit 9.7×10^5 Zellen pro Gramm Leber. Zusammenfassend wurde nach Immunisierung in den CD4dnIL10R α Mäusen eine Leberentzündung generiert, die jedoch durch eine verminderte Entzündungsstärke und Leukozyteninfiltration gegenüber der Hepatitis in den IL-10ko Mäusen gekennzeichnet war.

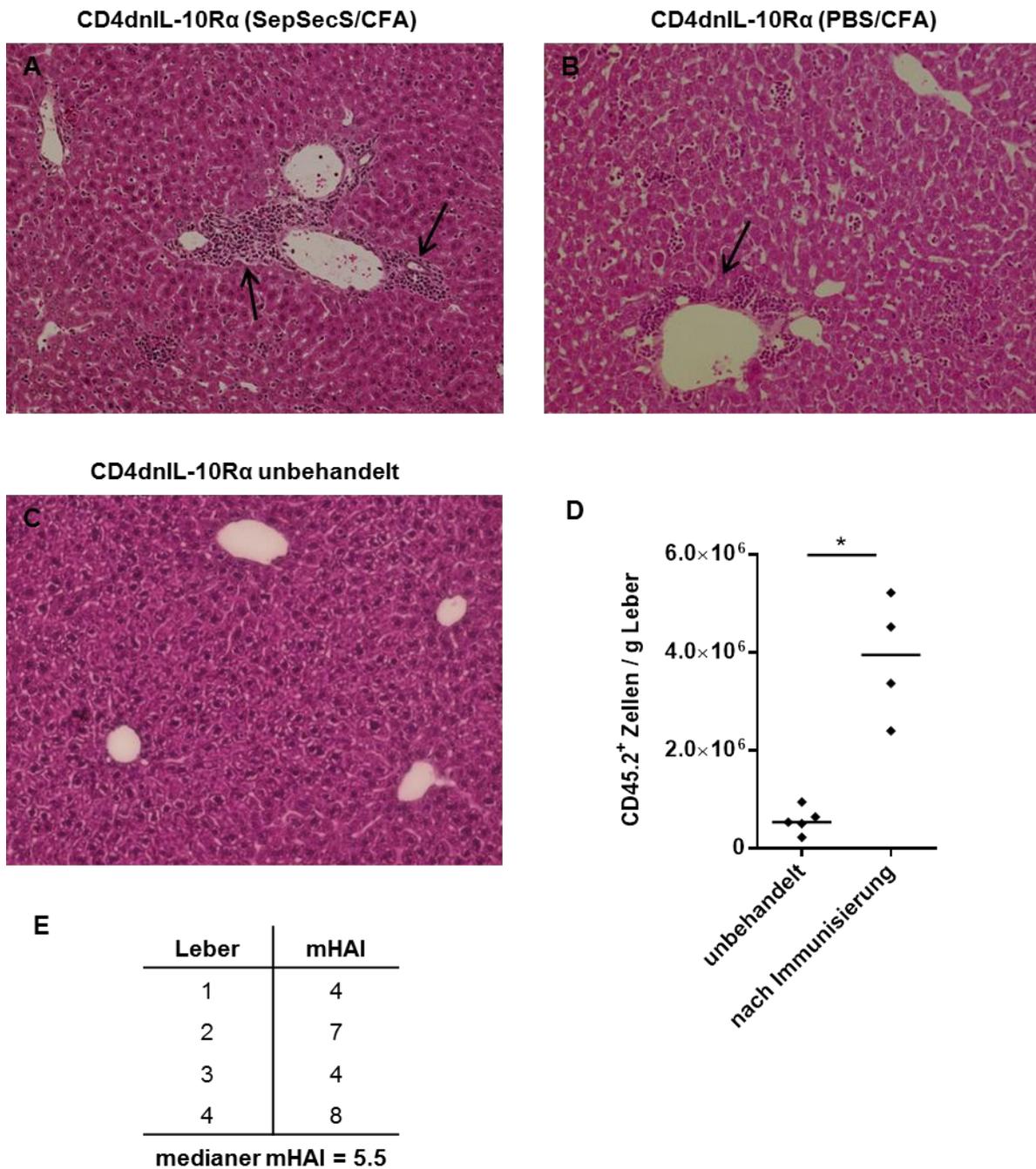


Abbildung 19: Leberhistologien, Leukozytenzahlen und mHAI der Leberentzündung von CD4dnIL10R α Mäusen

(A-C) Gezeigt sind repräsentative HE gefärbte Leberschnitte von CD4dnIL10R α Mäusen in 20facher Vergrößerung (A-B). CD4dnIL10R α Mäuse wurden im Abstand von drei Wochen zweimal intraperitoneal mit einem Gemisch aus rekombinantem SepSecS Protein (10 μ g) in CFA oder CFA in PBS immunisiert. Die abgebildeten Pfeile verweisen auf leukozytäre Infiltrate. (C) Leberschnitte un behandelter IL-10ko Mäuse. (D) Leberleukozyten von PBS/CFA-immunisierten oder un behandelten CD4dnIL10R α Mäusen wurden isoliert, mittels Durchflusszytometrie auf die Anteile CD45.2⁺ Zellen untersucht und die prozentualen Anteile auf die Zellzahl pro Gramm Leber extrapoliert. (D) mHAI der Leberentzündung mit PBS/CFA immunisierter CD4dnIL10R α Mäuse.

3.3.2 Erhöhte CD4⁺ T-Zellzahlen in den Lebern immunisierter CD4dnIL-10R α Mäuse

Es sollte untersucht werden, ob die Hepatitis immunisierter CD4dnIL10R α mit einer erhöhten Rekrutierung von T-Zellen in Verbindung steht. Hierzu wurden mononukleäre Zellen aus den Lebern immunisierter und unbehandelter CD4dnIL10R α Mäuse isoliert und durchflusszytometrisch die prozentualen Anteile der Gesamt-T-Zellen, sowie der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gemessen. Die erhaltenen prozentualen Anteile wurden dann auf die Zellzahl pro Gramm Leber extrapoliert. Die Lebern immunisierter CD4dnIL10R α Mäuse enthielten mit 3.9×10^6 T-Zellen pro Gramm Leber deutlich mehr T-Zellen als die Lebern unbehandelter Mäuse mit 5.7×10^5 Zellen pro Gramm Leber (Abbildung 20A, * $p=0.0159$). In der Subpopulation der CD8⁺ T-Zellen konnte keine erhöhte Zellzahl detektiert werden, diese waren in unbehandelten und immunisierten CD4dnIL10R α Mäusen im gleichem Maße nachweisbar (unbehandelt: 10.9×10^4 , immunisiert: 11.3×10^4 , Abbildung 20C). Allerdings konnten - ähnlich wie auch in den IL10ko Mäusen - signifikant erhöhte CD4⁺ T-Zellzahlen in den Lebern immunisierter Mäuse detektiert werden (Abbildung 20B, * $p=0.0286$), was auf eine erhöhte Rekrutierung von CD4⁺ T-Zellen schließen ließ.

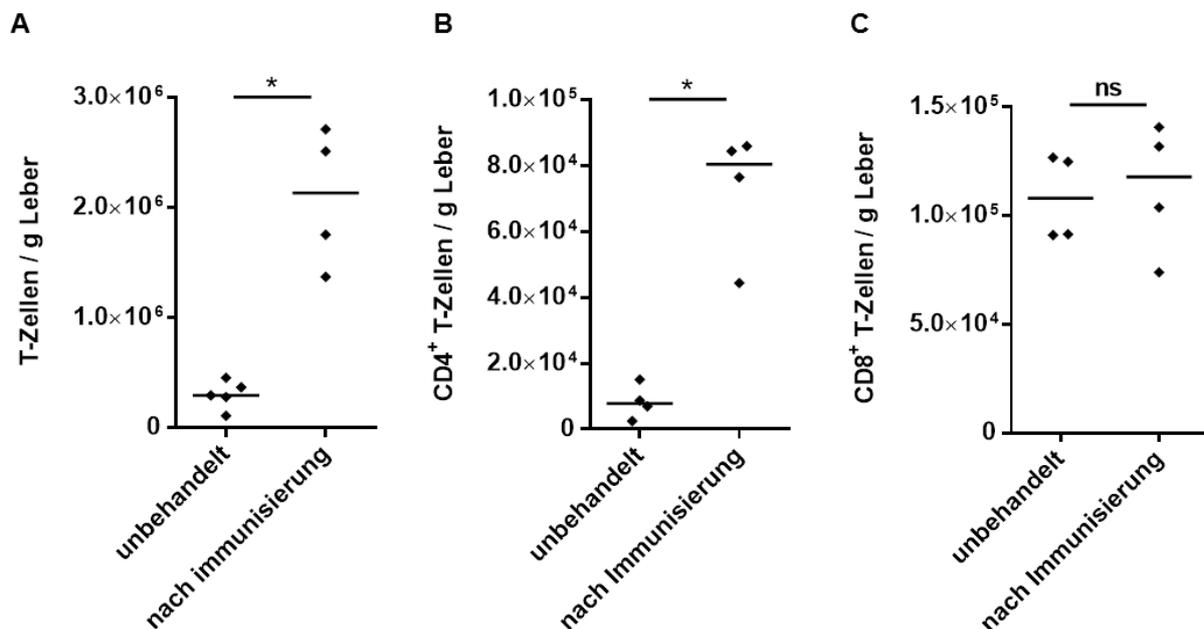


Abbildung 20: Anzahl der T-Zellen in den Lebern immunisierter und unbehandelter CD4dnIL10R α Mäuse

Leberleukozyten PBS/CFA immunisierter und unbehandelter CD4dnIL10R α Mäuse wurden isoliert und mittels Durchflusszytometrie auf die Anteile an (A) Gesamt-T-Zellen (CD3⁺) und den Subpopulationen der (B) CD4⁺ bzw. (C) CD8⁺ T-Zellen untersucht und die prozentualen Anteile auf die Zellzahl pro Gramm Leber extrapoliert.

* $p < 0.05$

In vergleichenden Analysen der IL-10ko und Wildtyp C57Bl/6 Mäuse konnte die vermehrte Rekrutierung von T-Zellen in Abwesenheit von IL-10 mit einer erhöhten Expression von inflammatorischen Chemokinen in der Leber in Verbindung gebracht werden. In den CD4dnIL10R α Mäusen sollte jedoch die erhöhte Rekrutierung der T-Zellen nicht durch einen erhöhten chemotaktischen Gradienten zur Leber getrieben sein, sondern lediglich durch die inflammatorischen Eigenschaften der T-Zellen, da nur die T-Zellen insensitiv gegenüber IL-10 waren. Zur Verifizierung dieser Hypothese wurden die Expressionsmuster von Chemokinen in Leberlysaten immunisierter CD4dnIL10R α und Wildtyp C57Bl/6 Mäuse vergleichend analysiert. Aufgrund seiner zuvor bestätigten quantitativ konsistenten Expression in Leberlysaten immunisierter CD4dnIL10R α und Wildtyp C57Bl/6 Mäuse eignete sich GAPDH auch hier ideal als Referenzgen. In Abbildung 21 sind die x-fachen Expressionsraten relativ zum Wildtyp C57Bl/6 dargestellt. Die Analysen ergaben, dass die Chemokine CXCL-9, CXCL-10, CXCL-11, CCL-20 und CCR-6 in den Lebern beider Mausgruppen in gleichem Maße exprimiert wurden. Lediglich die Expression der Chemokinrezeptoren CXCR-3 und CCR-5 konnten in den Lebern der CD4dnIL10R α Mäuse in signifikant erhöhtem Maße detektiert werden, was auf eine erhöhte Rekrutierung von T_H1 Zellen hindeutete. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Leberentzündung in den CD4dnIL10R α Mäusen mit einer erhöhten Rekrutierung von T-Zellen in die Leber in Verbindung steht, die jedoch nicht durch einen erhöhten Chemokingradienten zur Leber hin gesteuert wird.

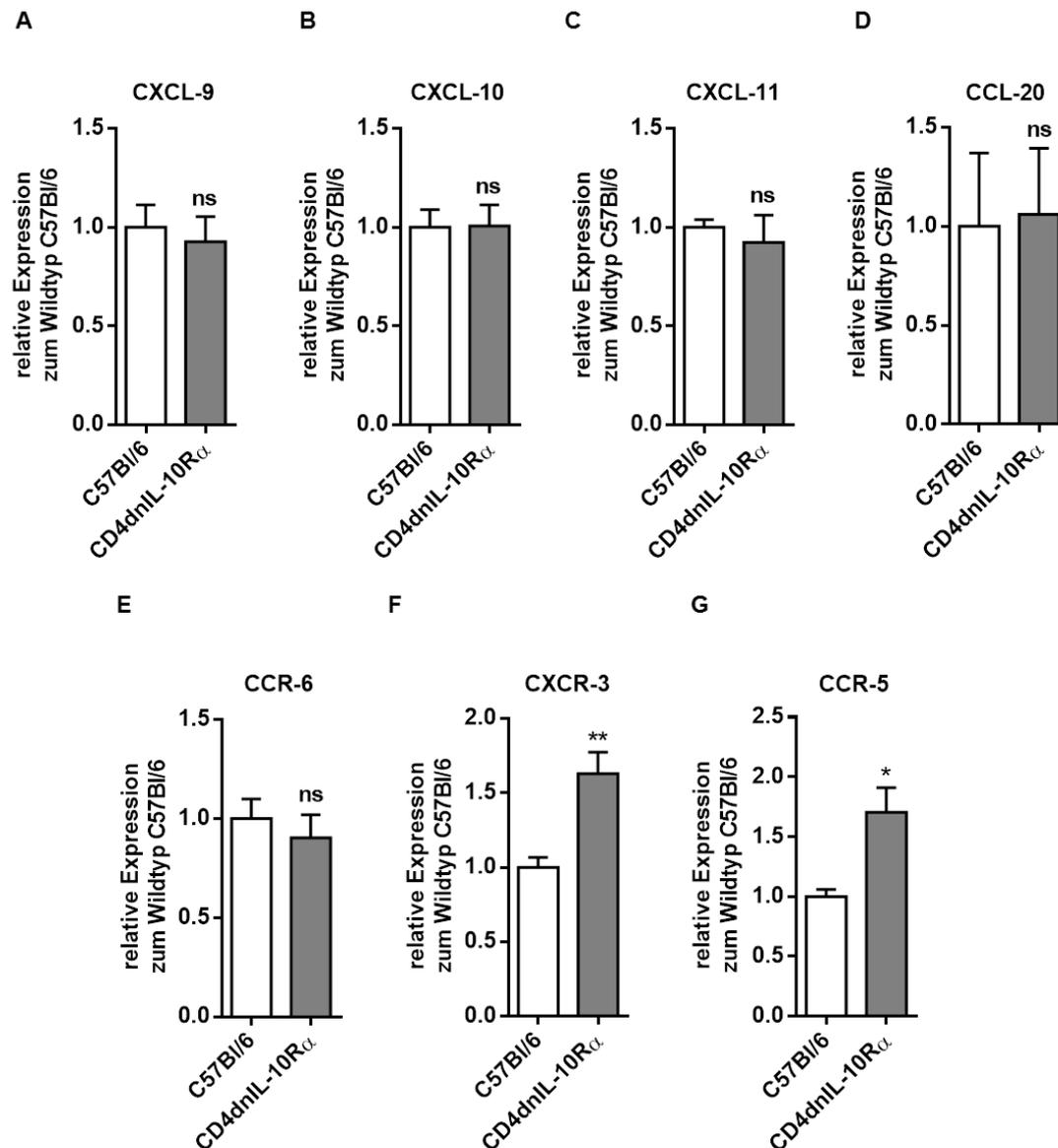


Abbildung 21: Expression von Chemokinrezeptoren und -liganden in den Lebern immunisierter CD4dnIL10R α Mäuse und Wildtyp C57Bl/6 Mäuse

In den Lebern PBS/CFA immunisierter CD4dnIL10R α und Wildtyp C57Bl/6 Mäuse wurde mittels quantitativer Real-Time PCR die Expression von (A) CXCL-9, (B) CXCL-10, (C) CXCL-11, (D) CCL-20, (E) CCR-6, (F) CXCR-3 und (G) CCR-5 ermittelt. Es wurde die relative Expression zum Haushaltsgen GAPDH bestimmt. Dargestellt sind die Expressionsraten relativ zur Expression im Wildtyp C57Bl/6. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

3.3.3 Vermehrte IFN γ , IL-17 und GM-CSF Ausschüttung durch T-Zellen in den Lebern von CD4dnIL-10R α Mäuse im Vergleich mit C57Bl/6 Mäusen

Der fehlende Einfluss von IL-10 in den IL-10ko Mäusen führte zu einer verstärkten Sekretion von IFN γ , IL-17 und GM-CSF durch CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zum Wildtyp C57Bl/6. Um zu prüfen, ob IL-10 einen direkten inhibitorischen Einfluss auf die Freisetzung dieser Zytokine durch T-Zellen besitzt, wurde nun die Zytokinsekretion intrahepatischer T-Zellen von Wildtyp C57Bl/6 und CD4dnIL10R α Mäusen vergleichend untersucht. Hierzu wurden

Leberleukozyten beider Versuchsgruppen isoliert, mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 restimuliert und die Zytokinsekretion in den Zellkulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Es stellte sich heraus, dass die T-Zellen der CD4dnIL10R α Mäuse im Vergleich zum Wildtyp C57Bl/6 signifikant mehr IFN γ (4317 pg/mL versus 1825 pg/mL, *p=0.0286), IL-17 (293 pg/mL versus 124 pg/mL, *p=0.0283) und GM-CSF (266 pg/mL versus 41 pg/mL, **p=0.0025) sezernierten (Abbildung 22).

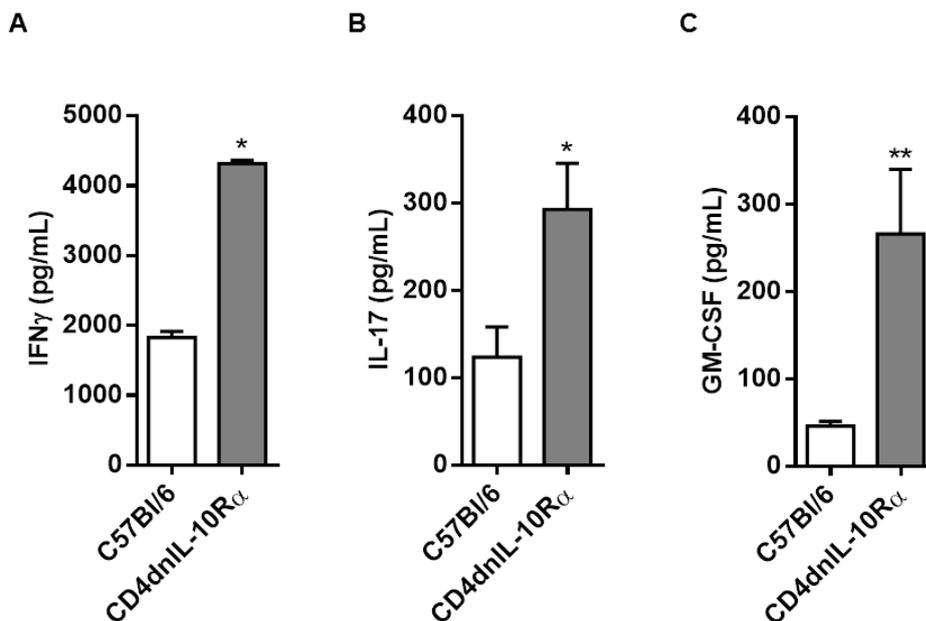


Abbildung 22: Zytokinprofil intrahepatischer T-Zellen in CD4dnIL10R α und Wildtyp C57Bl/6 Mäusen

5×10^5 Leberleukozyten immunisierter CD4dnIL10R α und C57Bl/6 Mäuse wurden mit einem Antikörper gegen CD3 (3 μ g/mL) und CD28 (3 μ g/mL) für 24 h bei 37°C restimuliert und die Sekretion der Zytokine (A) IFN γ , (B) IL-17 und (C) GM-CSF im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. *p<0.05, **p<0.01

3.3.4 Die verstärkte Aktivierung von T-Zellen in CD4dnIL-10R α Mäusen korreliert nicht mit einer erhöhten Expressionen von MHCII und kostimulatorischen Molekülen

Die vermehrte Zytokinsekretion der T-Zellen in den CD4dnIL10R α Mäusen ließ auf eine erhöhte Aktivierung der T-Zellen schließen. Zur Analyse des Aktivierungsstatus der T-Zellen wurde die Expression von PD-1 vergleichend in den Lebern der CD4dnIL10R α und Wildtyp C57Bl/6 Mäusen untersucht. Im Vergleich zum Wildtyp konnte in den Lebern der CD4dnIL10R α Mäuse eine bis zu 2fach erhöhte Expression von PD-1 nachgewiesen werden (Abbildung 23A). In den IL-10ko Mäusen korrelierte der erhöhte Aktivierungsstatus der T-Zellen mit erhöhten antigenpräsentierenden und kostimulatorischen Eigenschaften in der Leber (Abbildung 14). Diese Korrelation sollte in den CD4dnIL10R α Mäusen jedoch nicht zutreffen, da die APCs hier wie in den Wildtyp C57Bl/6 Mäusen dem inhibierenden Einfluss von IL-10 gleichermaßen ausgesetzt sind. Um dies zu überprüfen, wurde die Expression von

MHCII (H2-Ab1), CD80 und CD86 vergleichend in den Lebern der CD4dnIL10R α und Wildtyp C57Bl/6 Mäuse bestimmt.

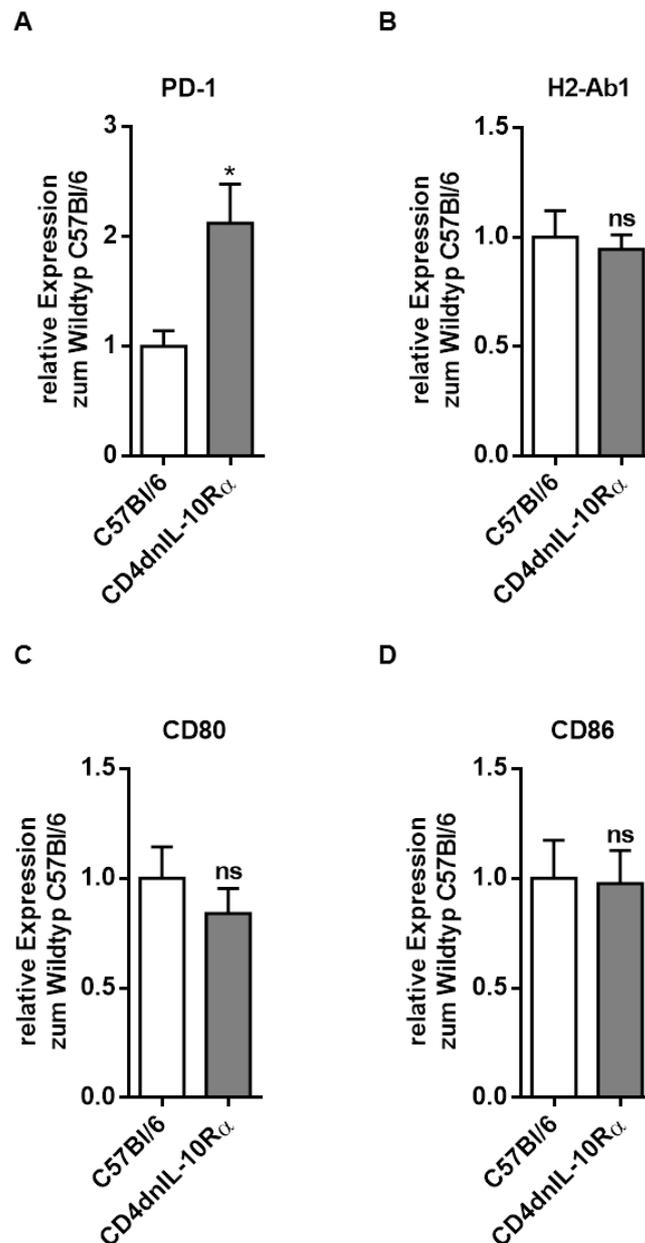


Abbildung 23: Relative Expression von PD-1, MHCII und kostimulatorischen Molekülen in den Lebern immunisierter CD4dnIL10R α und C57Bl/6 Mäuse

Aus den Lebern PBS/CFA immunisierter CD4dnIL10R α und Wildtyp C57Bl/6 Mäuse wurde mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer Real-Time PCR die Expression von (A) PD-1, (B) MHCII (H2-Ab1), (C) CD80 und (D) CD86 ermittelt. Es wurde die relative Expression zum Haushaltsgen GAPDH bestimmt. Dargestellt sind die Expressionsraten relativ zur Expression im Wildtyp C57Bl/6. * $p < 0,05$

Den Erwartungen entsprechend konnten keine Unterschiede in den Expressionsniveaus von MHCII, CD80 und CD86 in den Versuchsgruppen detektiert werden (Abbildung 23B-D). Diese Ergebnisse zeigen, dass die fehlende IL-10-Signalgebung in den T-Zellen selber zu einer erhöhten Aktivierung der Zellen beiträgt.

3.4 Charakterisierung des Einflusses der IL-10 Signalgebung auf T-Zellen bei der T-Zelldifferenzierung

In IL-10 defizienten Mäusen konnte eine verstärkte Differenzierung zu T_H1 und T_H17 Zellen nachgewiesen werden, die bereits bei der initialen T-Zellaktivierung in den drainierenden Lymphknoten nachweisbar war. Im folgenden Abschnitt sollte nun mit Hilfe der CD4dnIL10R α Mäuse untersucht werden, ob dieser Effekt auf eine direkte Wirkung von IL-10 auf T-Zellen zurückgeführt werden kann.

3.4.1 Gleiche T-Zellzusammensetzung in den Lymphknoten der CD4dnIL10R α und Wildtyp C57Bl/6 Mäuse

In IL-10ko Mäusen wurde eine erhöhte Expansion von CD4⁺ T-Zellen bei der Initiierung der Immunantwort in den Lymphknoten beobachtet. Um zu prüfen, ob IL-10 durch direkte Wirkung auf T-Zellen die Expansion von T-Zellen beeinflusst, wurden CD4dnIL10R α und C57Bl/6 Mäuse mit PBS/CFA subkutan in den Fuß immunisiert, nach zehn Tagen die drainierenden poplitealen Lymphknoten entnommen und die Lymphozyten isoliert. Mittels Durchflusszytometrie erfolgte dann der Nachweis der absoluten Zellzahlen an Gesamtlymphozyten, T-Zellen sowie der CD4⁺ T-Zellen und der CD8⁺ T-Zellen. Es zeigte sich, dass die Lymphknoten der CD4dnIL10R α und C57Bl/6 Mäuse gleiche Anzahlen an Gesamtlymphozyten und T-Zellen enthielten (Abbildung 24A, B). Auch in der Verteilung der CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen waren keine Unterschiede detektierbar (Abbildung 24C, D). Zusammen zeigen diese Ergebnisse, dass die in IL-10ko Mäusen beobachtete T-Zellexpansion nicht auf einer direkten inhibitorischen Wirkung von IL-10 auf T-Zellen selbst beruht.

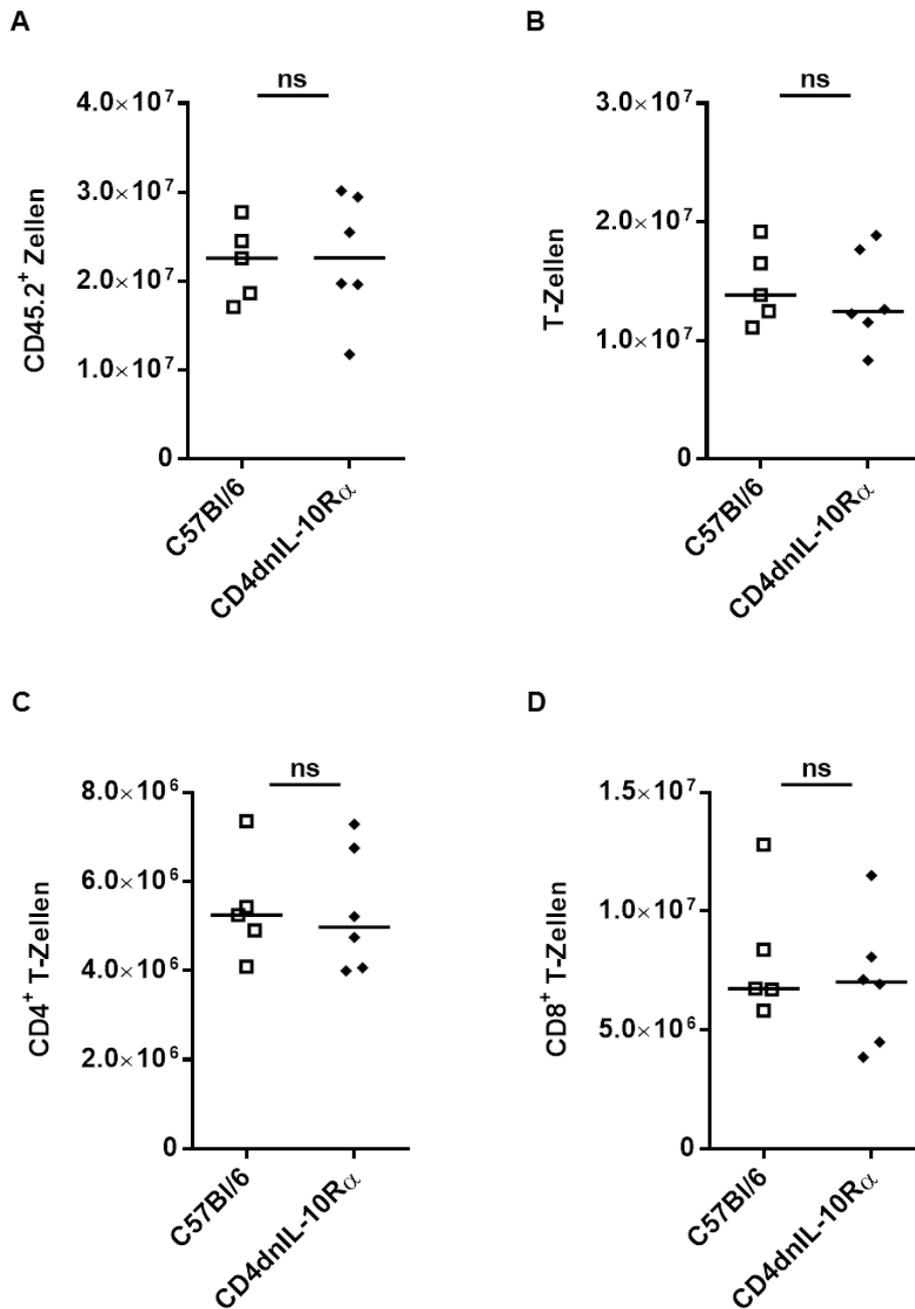


Abbildung 24: Zellzahlen der CD45.2⁺ Lymphozyten, T-Zellen (CD3⁺), CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Zellen in den Lymphknoten immunisierter CD4dnIL10R α und Wildtyp C57Bl/6 Mäuse

Die politealen Lymphknoten PBS/CFA immunisierter CD4dnIL10R α und C57Bl/6 Mäusen wurden isoliert und die Gesamtzellzahl an (A) CD45.2⁺ Lymphozyten, (B) Gesamt-T-Zellen (CD3⁺) sowie der Subpopulationen an (C) CD4⁺ und (D) CD8⁺ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

3.4.2 Erhöhte T_H1 und T_H17 Differenzierung im Vergleich zum Wildtyp C57Bl/6, vermindert im Vergleich zu IL-10 defizienten Mäusen

Die Abwesenheit des inhibierenden Einflusses von IL-10 führte in den IL-10ko Mäusen neben der vermehrten Expansion von CD4⁺ T-Zellen bei der Initiation der Immunantwort in den Lymphknoten zu einer erhöhten T_H1 und T_H17 Differenzierung. Die Reaktionsunfähigkeit

der T-Zellen auf IL-10 hatte in den CD4dnIL10R α Mäusen keinen Einfluss auf die Expansion von CD4⁺ T-Zellen, jedoch könnte IL-10 die Differenzierung dieser Zellen zu T_H1 und T_H17 Zellen selektiv beeinflussen. Um den Einfluss von IL-10 auf die T-Zelldifferenzierung genauer beschreiben zu können, wurden die folgenden Analysen vergleichend in den CD4dnIL10R α , IL-10ko und Wildtyp C57Bl/6 Mäusen durchgeführt. Zunächst wurde in den drei Versuchsgruppen das Zytokinprofil der T-Zellen untersucht. Hierzu wurden aus den Lymphknoten immunisierter Mäuse Lymphozyten isoliert, T-Zellspezifisch mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 restimuliert und die Sekretion der Zytokine IFN γ , IL-17 und GM-CSF in den Zellkulturüberständen gemessen. Hierbei zeigte sich, dass die T-Zellen der CD4dnIL10R α im Vergleich zum Wildtyp C57Bl/6 mehr IFN γ (20.0 ng/mL versus 9.3 ng/mL), IL-17 (698 pg/mL versus 149 pg/mL) und GM-CSF (379 pg/mL versus 260 pg/mL) sezernierten (Abbildung 25). Im Vergleich mit IL-10ko Mäusen bildeten T-Zellen von CD4dnIL10R α Mäuse jedoch signifikant weniger IFN γ (20ng/mL versus 45 ng/mL), IL-17 (698 pg/mL versus 1549 pg/mL) und GM-CSF (379 pg/mL versus 519 pg/mL).

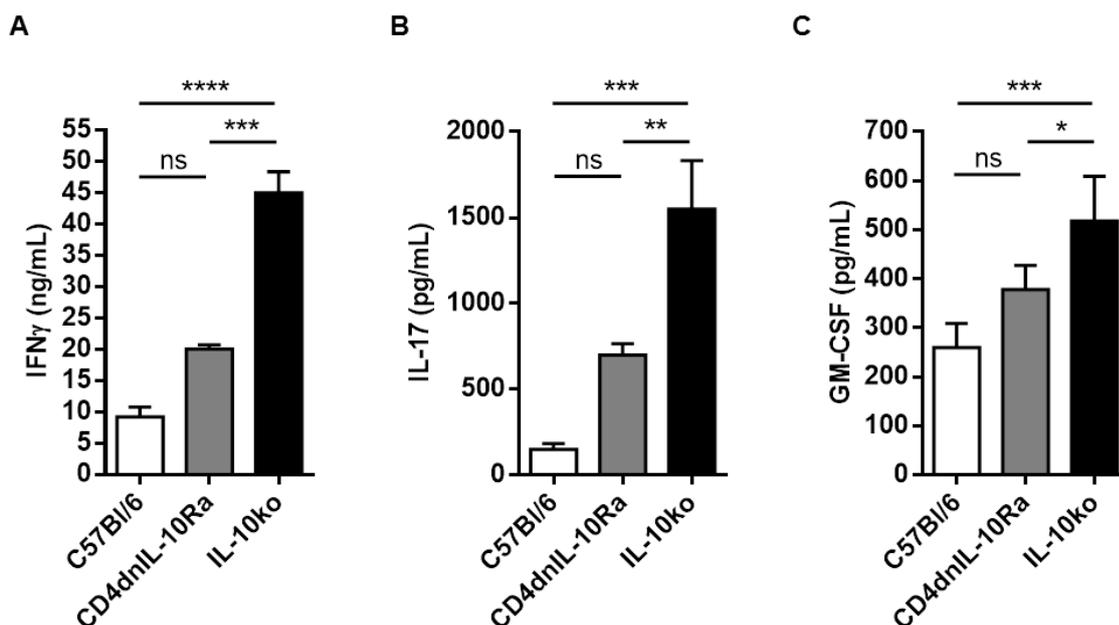


Abbildung 25: vergleichendes Zytokinprofil der T-Zellen immunisierter CD4dnIL10R α , IL-10ko und Wildtyp C57Bl/6 Mäuse bei der Initialen Immunantwort im Lymphknoten

5x10⁵ mononukleäre Zellen aus den Lymphknoten immunisierter Wildtyp C57Bl/6, CD4dnIL10R α und IL-10ko Mäuse wurden T-Zellspezifisch mit einem Antikörper gegen CD3 und CD28 für 24 h bei 37 °C restimuliert und die Zytokine (A) IFN γ , (B) IL-17 und (C) GM-CSF im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001

Der mögliche direkte Einfluss von IL-10 auf die T-Zelldifferenzierung wurde in einem zweiten Ansatz überprüft. Hierfür wurden isolierte Lymphozyten aus den Lymphknoten der drei Versuchsgruppen mit PMA/Ionomycin restimuliert und der Anteil an T_H1 und T_H17 Zellen

mittels intrazellulärer Färbung der Zytokine IFN γ und IL-17 und Anfärbung von CD3 und CD4 untersucht. Bei den durchflusszytometrischen Analysen wurde deutlich, dass in den CD4dnIL10R α Mäusen im Vergleich mit Wildtyp C57Bl/6 Tieren signifikant mehr T_H1 und T_H17 Zellen aufwiesen (Abbildung 26). Der Anteil an T_H1 Zellen betrug dabei in den CD4dnIL10R α Mäusen 4.7 % gegenüber 3.0 % in den Wildtypen (Abbildung 26A). Zudem waren in den CD4dnIL10R α Mäusen signifikant mehr T_H17 Zellen detektierbar. Nach Stimulation zeigten 2.7 % der CD4⁺ T-Zellen der CD4dnIL10R α Mäuse den T_H17 Phänotyp, in den Wildtypen C57Bl/6 waren es mit 1.1 % signifikant weniger (Abbildung 26B). Die Induktion von T_H1 sowie T_H17 Zellen war in IL-10ko Mäusen jedoch noch wesentlich ausgeprägter. Diese Tiere wiesen 7.7 % IFN γ -produzierende CD4⁺ T-Zellen und 5.3 % IL-17-produzierende CD4⁺ T-Zellen und damit gegenüber CD4dnIL10R α Mäusen fast doppelt so viele T_H1 und T_H17 Zellen auf (Abbildung 26A, B). Auffällig war zudem, dass IL-10ko Mäuse eine signifikant erhöhte Frequenz von T_H1/T_H17 Zellen aufwiesen, die sowohl IFN γ als auch IL-17 exprimierten. Für diese Zellpopulation waren dagegen keine Unterschiede zwischen Wildtyp C57Bl/6 und CD4dnIL10R α Mäusen feststellbar (Abbildung 26C).

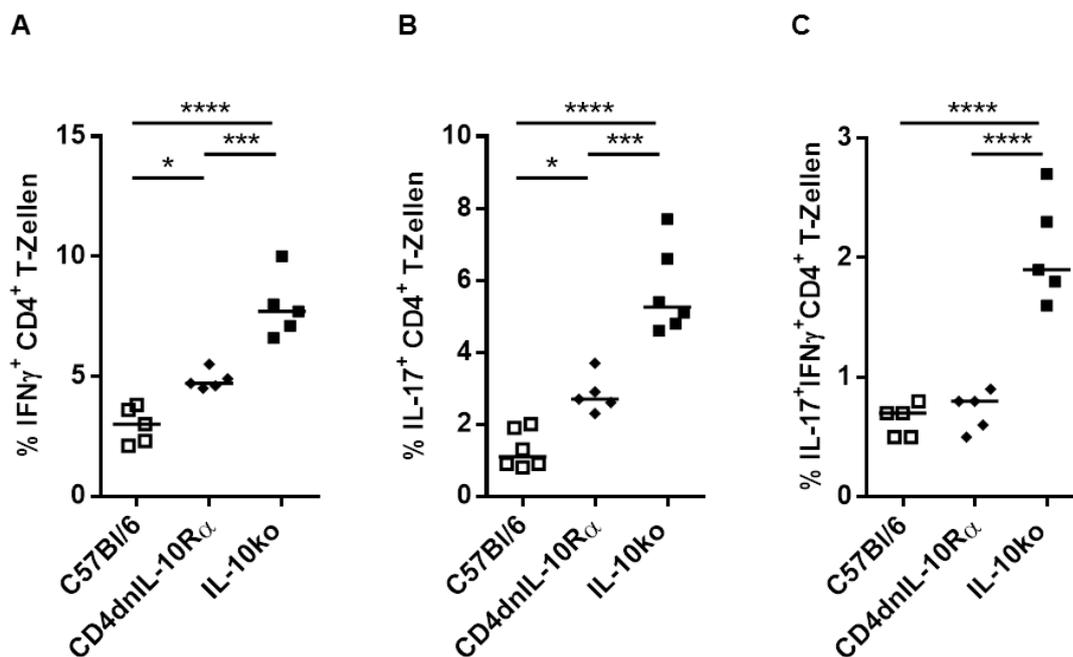


Abbildung 26: Quantitative Auswertung der IL-17 und IFN γ positiven CD4⁺ T-Zellen bei der Initiation der Immunantwort im Lymphknoten

Lymphknotenzellen aus Wildtyp C57Bl/6, CD4dnIL10R α und IL-10ko Mäusen wurden für 4 h mit PMA/Ionomycin restimuliert und durchflusszytometrisch die prozentualen Anteile der (A) IFN γ ⁺, (B) IL-17⁺ und (C) IL-17⁺IFN γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen bestimmt. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass IL-10 nicht ausschließlich durch indirekte Einflüsse auf T-Zellen wirkt, sondern auch direkt durch die IL-10 Signalgebung in T-Zellen die Differenzierung von T_H1 und T_H17 Zellen beeinflusst wird.

4. Diskussion

Die Pathogenese autoimmuner Lebererkrankungen ist bisher noch unzureichend verstanden. Störungen der Immunregulation scheinen jedoch an der Pathogenese beteiligt zu sein. Hierbei scheint eine Inbalance zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Immunantworten zu bestehen. Bei Patienten mit autoimmunen Lebererkrankungen können vermehrt proinflammatorische T-Zellen nachgewiesen werden, die Anzahl bzw. suppressive Funktion regulatorischer T-Zellen scheint jedoch verringert zu sein. Regulatorische T-Zellen sind u.a. durch die Sekretion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 charakterisiert und können Toleranz induzieren, indem sie proinflammatorische Immunantworten supprimieren. Neben der verringerten Anzahl regulatorischer T-Zellen sowie deren Funktionsverlust kann bei Patienten mit autoimmunen Lebererkrankungen ebenfalls eine Reduktion der Expression anti-inflammatorischer Zytokine, wie beispielsweise IL-10, beobachtet werden. In verschiedenen Hepatitis-Modellen wurde IL-10 eine hepatoprotektive Wirkung zugesprochen. Wie genau IL-10 zur Regulation autoimmuner Leberentzündungen beitragen kann, ist bisher jedoch noch unzureichend verstanden. Ziel dieser Arbeit war es daher, immunregulatorische Mechanismen von IL-10 zu identifizieren, die die Progression von autoimmunen Lebererkrankungen beeinflussen könnten.

4.1 IL-10 nimmt eine bedeutende regulatorische Funktion bei der induzierten Hepatitis im Mausmodell ein

Im verwendeten Mausmodell wurde durch intraperitoneale Immunisierung mit SepSecS und dem Adjuvant CFA eine Hepatitis induziert²⁶⁴. SepSecS ist das Zielantigen von SLA/LP Autoantikörpern, die krankheitsspezifisch für die AIH zu sein scheinen, da sie im Gegensatz zu den anderen nachweisbaren Autoantikörpern nicht bei weiteren Lebererkrankungen und nicht-hepatischen autoimmunen Erkrankungen detektiert werden^{242,251-253}. SepSecS ist hochkonserviert und wird u.a. in der Leber exprimiert. Migrieren autoreaktive T-Zellen im Zuge von Entzündungen in die Leber und werden hier nicht ausreichend reguliert, könnten sie autoimmune Pathologien induzieren.

Um den Einfluss von IL-10 auf die Leberentzündung und die Beteiligung SepSecS-spezifischer autoreaktiver T-Zellen differenziert beurteilen zu können, wurden IL-10ko Mäuse und Wildtyp Mäuse sowohl Autoantigen-spezifisch mit SepSecS/CFA als auch Autoantigen-unspezifisch mit PBS/CFA immunisiert und die Ausprägung und der Schweregrad der Leberentzündung untersucht. Im Gegensatz zu Wildtyp Mäusen, die keine histologisch erkennbare Hepatitis entwickelten, generierten IL-10ko Mäuse eine Hepatitis, die durch periportale und lobuläre Infiltrate gekennzeichnet war (Abbildung 1A-D). Die histologische Beurteilung nach dem mHAI-Score bestätigte eine signifikant erhöhte

hepatische Entzündungsaktivität in den IL-10ko Mäusen im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 3). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung, führte auch die Behandlung von Wildtyp Mäusen mit einem blockierenden Antikörper gegen den IL-10R sowohl nach Autoantigen-spezifischer Immunisierung als auch nach Autoantigen-unspezifischer Immunisierung zur Generierung einer Hepatitis mit portalen, periportalen und lobulären Infiltraten (Abbildung 2A, B). Beide Versuchsgruppen zeigten dabei eine vergleichbar ausgeprägte hepatische Entzündung, die mit einem medianen mHAI von 8.0 beurteilt wurde (Abbildung 3). Ebenso entwickelten auch IL-10ko Mäuse, die lediglich mit PBS/CFA immunisiert wurden, eine vergleichbar ausgeprägte Hepatitis wie IL-10ko Mäuse, die Autoantigen-spezifisch mit SepSecS immunisiert wurden (Abbildung 1C, D). Diese Daten spiegeln im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant erhöhte hepatische Entzündung in IL-10ko und in Wildtyp Mäusen wieder, in denen durch Blockade des IL-10 Rezeptors die Aktivität von IL-10 nicht mehr vermittelt werden konnte. In Übereinstimmung mit diesen histologischen Beobachtungen wiesen die Lebern von IL-10ko Mäusen im Vergleich zum Wildtyp sowohl nach Autoantigen-spezifischer als auch nach unspezifischer Immunisierung eine signifikant erhöhte Anzahl leberinfiltrierender Leukozyten auf (Abbildung 4). Gemeinsam belegen diese Experimente eine bedeutende Rolle der regulatorischen Funktion von IL-10 bei der Ausbildung einer Hepatitis in diesem Modell. Die Ergebnisse deuten weiter darauf hin, dass allein der fehlende Einfluss von IL-10 die Infiltration und Akkumulation von Leukozyten in der Leber begünstigt und diese nicht Antigen-abhängig induziert wurde.

Diese Ergebnisse fügen sich in eine Reihe von Studien ein, die eine verstärkte Infiltration und Akkumulation von Leukozyten in der Leber in Abhängigkeit von IL-10 beschreiben. So führte die IL-10-Defizienz in einem Modell der Tetrachlormethan (CCl_4)-induzierten fibrotischen Hepatitis zur verstärkten hepatischen Akkumulation von Leukozyten, hierunter von Neutrophilen, im Vergleich zum Wildtyp²⁷⁴. In zwei weiteren Modellen wurde die Hepatitis durch Aktivierung von zirkulierenden oder leberresidierenden Makrophagen vermittelt. Hierbei führte die Administration eines Antikörpers gegen IL-10 in einem Modell der Galaktosamin/LPS-induzierten Hepatitis zur Zunahme der Leberentzündung, die Behandlung mit rekombinantem IL-10 hingegen zur Reduktion der Leberentzündung und der hepatischen Akkumulation von Neutrophilen^{215,216}. Auch in einem weiteren Modell der durch *Toxoplasma gondii*-vermittelten Hepatitis wiesen IL-10ko Mäuse im Vergleich zum Wildtyp eine stärkere Leberpathologie auf, die durch die Zunahme inflammatorischer Infiltrate in der Leber gekennzeichnet war²⁷⁵.

IL-10ko Mäuse, die mit PBS/CFA oder SepSecS/CFA immunisiert wurden, wiesen generell erhöhte leukozytäre Zellinfiltrate in der Leber auf, die überwiegend T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und Neutrophile enthielten (Abbildung 5). Diese Beobachtungen legen nahe, dass IL-10 nicht nur die Infiltration von T-Zellen, sondern auch von anderen Zellen wie

Makrophagen und Neutrophilen in die Leber reguliert. Diese können neben T-Zellen ebenfalls zur Pathologie beitragen. So wurde gezeigt, dass die chemische Depletion von Makrophagen und KCs mit Chlodronat in einem Modell der Gallengangsligatur-induzierten Leberfibrose zu einer deutlich reduzierten Leberpathologie führt²⁷⁶. In Autoantigen-spezifisch und -unspezifisch immunisierten IL-10ko Mäusen waren jedoch keine signifikanten Unterschiede in der prozentualen hepatischen Verteilung dieser Zellpopulationen feststellbar (Abbildung 5). Die Autoantigen-spezifische Immunisierung beeinflusst daher nicht grundsätzlich die Art der Immunreaktion in den Lebern der IL-10ko Mäuse.

In vergleichenden Analysen der intrahepatischen T-Zellzahlen in IL-10ko im Vergleich mit Wildtyp Mäusen wurde in IL-10ko Mäusen eine signifikant erhöhte CD3⁺T-Zellzahl nachgewiesen (Abbildung 6A). In IL-10ko Mäusen, die Autoantigen-spezifisch oder -unspezifisch immunisiert wurden, akkumulierten CD3⁺ T-Zellen in gleichem Maße in der Leber (Abbildung 5A). Nach Aktivierung exprimieren T-Zellen PD-1²⁷⁷, dessen hepatische Expression bei AIH-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht ist und positiv mit der Akkumulation von CD3⁺ T-Zellen in der Leber korreliert²⁷⁸. Die signifikant erhöhte hepatische Expression von PD-1 in IL-10ko Mäusen im Vergleich zum Wildtyp spiegelte auch in den IL-10ko Mäusen einen erhöhten Aktivierungsstatus intrahepatischer T-Zellen wieder und korrelierte zudem positiv mit der vermehrten Infiltration von CD3⁺ T-Zellen in die Leber (Abbildung 6A, Abbildung 14A). Naive, unstimulierte T-Zellen migrieren nur zu einem geringen Teil in die Leber und werden im Vergleich zu aktivierten T Zellen weniger stark in der Leber retiniert^{279,280}. Nach Aktivierung exprimieren T-Zellen inflammatorische Chemokinrezeptoren, die ihnen die Migration in die Leber ermöglichen (s. Abschnitt 4.2.2). Dies legt die Vermutung nahe, dass das Fehlen von IL-10 auch bei der Autoantigen-unspezifischen Immunisierung mit CFA die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen fördert und diese auch in Abwesenheit eines spezifischen Antigens in die Leber migrieren und eine Hepatitis auslösen können. Es wurde beschrieben, dass IL-10 die Expression von Chemokinrezeptoren in DCs verhindert, durch die reife DCs in die sekundären lymphatischen Organe migrieren können^{281,282}. Fehlt diese Regulation durch IL-10 können aktivierte, reife DCs aus der Leber verstärkt in die sekundären lymphatischen Organe einwandern, um T-Zellen zu aktivieren. Da auch die Immunisierung mit CFA eine Entzündung in der Leber verursacht, die zur Reifung von DCs führen kann, könnte dies eine mögliche Erklärung für die in IL-10ko Mäusen beobachtete unspezifische T-Zellaktivierung sein. Dass auch die unspezifische Aktivierung von T-Zellen eine Hepatitis induzieren kann, ist in der Literatur belegt. So entwickeln auch Mäuse, deren T-Zellen durch Injektion mit ConA *in vivo* polyklonal aktiviert wurden, eine ausgeprägte Leberentzündung, die durch Neutralisation von IL-10 noch verstärkt und durch die Gabe von rekombinantem IL-10 gemildert werden kann^{217,218}. In der Leber SepSecS-immunisierter Mäuse waren allerdings

auch Autoantigen-spezifische T-Zellen nachweisbar, die bei Restimulation mit SepSecS vermehrt proinflammatorische Zytokine sezernierten (Abbildung 12).

4.2 Untersuchungen zum Wirkmechanismus von IL-10

4.2.1 IL-10 reguliert bereits die frühe T-Zellaktivierung und –differenzierung zu T_H1 und T_H17 Zellen

In den Lebern der IL-10ko Mäuse wurde neben einer erhöhten Akkumulation von CD8⁺ T-Zellen insbesondere eine verstärkte Akkumulation von T_H1 und T_H17 Zellen im Vergleich mit Wildtyp Mäusen nachgewiesen (Abbildung 6, Abbildung 10). Diese Beobachtung zeigt, dass IL-10 die Ausbildung dieser Zellen inhibiert. Um zu prüfen, ob IL-10 seine inhibitorische Wirkung dabei bereits bei der initialen T-Zellaktivierung in den sekundären lymphatischen Organen und/oder später im betroffenen Organ entfaltet, wurde die Expansion und Differenzierung proinflammatorischer T-Zellen in den Lymphknoten untersucht. In vergleichenden Analysen der T-Zellen in den Lymphknoten der IL-10ko und Wildtyp Mäuse wurden keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl von CD3⁺ T-Zellen nachgewiesen (Abbildung 15B). Allerdings wiesen IL-10ko Mäuse gegenüber Wildtyp Tieren veränderte Verhältnisse von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen auf. So konnten in den Lymphknoten der IL-10ko Mäuse signifikant mehr CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 15C), was auf eine erhöhte Aktivierung und Expansion dieser Zellen in den IL-10ko Mäusen schließen ließ. Leider stand keine Methode zur Verfügung, um den Anteil Autoantigen-spezifischer T-Zellen unter diesen nachzuweisen, so dass hierüber keine Aussage getroffen werden kann. Im Gegensatz zu den CD4⁺ T-Zellen, war die Expansion von CD8⁺ T-Zellen in IL-10ko Mäusen vermindert (Abbildung 15D). Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit Studien, in denen stimulierende Effekte von IL-10 auf die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen und inhibierende Effekte von IL-10 auf die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen beschrieben wurden. Diese werden zu einem großen Teil indirekt durch den Einfluss von IL-10 auf die Funktion von APCs vermittelt. So wurde gezeigt, dass IL-10 zwar die MHC-I-Expression von DCs nicht beeinflusst²⁸³, *in vitro* jedoch die IL-2-abhängige Expansion humaner CD8⁺ T-Zellen induzieren kann^{284,285}. Dagegen inhibiert IL-10 die Expression von MHCII, Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und kostimulatorischer Moleküle wie CD80 und CD86 auf professionellen APCs^{283,286-292}. Auf diese Weise kann IL-10 die Produktion von IL-2, dem wichtigsten Wachstumsfaktor von allen T-Zellen, und in der Folge die Expansion von CD4⁺ T-Zellen inhibieren^{225,293,294}. In Wildtyp Mäusen führt der Einfluss von IL-10 somit zur verminderten Aktivierung naiver CD4⁺ T-Zellen und folglich zur verminderten Expansion dieser Zellen im Vergleich zu IL-10ko Mäusen. Trotz verstärkter Aktivierung und Expansion zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen in Wildtyp Mäusen migrieren diese

jedoch nicht verstärkt in die Leber, was u.a. auf den inhibierenden Einfluss von IL-10 auf die Chemokinexpression in der Leber zurückgeführt werden kann (Abbildung 6, Abbildung 7). Anschließend wurde überprüft, ob IL-10 die Differenzierung zu proinflammatorischen T_H1 und T_H17 Zellen hemmt und hierdurch zur Kontrolle autoimmuner Lebererkrankungen beiträgt. Hierzu wurden die Effektorantworten der CD4⁺ T-Zellen in den Lymphknoten untersucht. Sowohl nach Autoantigen-unspezifischer Stimulation der CD4⁺ T-Zellen als auch nach Autoantigen-spezifischer Stimulation mit SepSecS in Anwesenheit von Wildtyp DCs, zeigten CD4⁺ T-Zellen aus IL-10ko Mäusen durch die signifikant erhöhte Sekretion von IFN γ , IL-17 und GM-CSF ein verstärktes T_H1 und T_H17 Zytokinprofil (Abbildung 17, Abbildung 18). In durchflusszytometrischen Analysen wurden zudem signifikant mehr T_H1 und T_H17 Zellen in IL-10ko Mäusen im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen (Abbildung 26A, B). Hierbei fiel auf, dass ebenso wie zuvor in der Leber beobachtet, signifikant mehr CD4⁺ T-Zellen in IL-10ko Mäusen im Vergleich zum Wildtyp detektierbar waren, die IFN γ und IL-17 ko-produzierten und somit einen gemischten T_H1/T_H17 Phänotyp aufwiesen (Abbildung 26C). Die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen in verschiedene Subpopulationen ist von den Bedingungen abhängig, unter denen die Aktivierung erfolgt. Einfluss nehmen sowohl die Stärke der Stimulation und die Dichte des Antigens auf den APCs als auch das umgebende Zytokinmilieu^{92,93}. In Anwesenheit von TGF β und IL-6 oder IL-1 β und IL-6 wird die Differenzierung zu T_H17 Zellen induziert¹⁵⁰⁻¹⁵³. Die Sekretion dieser Zytokine wurde in den Lymphknoten nicht bestimmt. Sie werden jedoch in der Leber von IL-10ko Mäusen verstärkt exprimiert (Abbildung 13). Übereinstimmend hiermit wurde in einer Studie von Wilke *et al.* beschrieben, dass DCs aus IL-10ko Mäusen *in vitro* signifikant mehr IL-1 β und IL-6 im Vergleich zu DCs aus Wildtyp Mäusen sezernieren und auf diese Weise die Entwicklung von T_H17 Zellen in Abwesenheit von IL-10 gefördert wird²⁹⁵. So konnten nach *in vitro* Kokultur von Wildtyp T-Zellen mit DCs aus IL-10-defizienten Mäusen mehr T_H17 Zellen nachgewiesen werden als in Kokultur mit Wildtyp DCs. In einer Kultur von DCs mit IL-1R-defizienten T-Zellen entwickelten sich dagegen wesentlich weniger T_H17 Zellen als in der Kultur von DCs mit IL-1R⁺ T-Zellen²⁹⁵.

Zudem sezernieren DCs aus IL-10ko Mäusen weniger IL-27 als DCs aus Wildtyp Mäusen²⁹⁶. Dieses Zytokin inhibiert die Differenzierung zu T_H17 Zellen, während es nur einen geringen Einfluss auf bereits konvertierte T_H17 Zellen hat²⁹⁷⁻³⁰². Auch nach Aktivierung durch LPS wurde die IL-27-Sekretion von IL-10-defizienten DCs nicht gesteigert. Darüber hinaus führte die Behandlung von LPS-aktivierten Wildtyp-DCs mit IL-10 zur verminderten Sekretion von IL-27. Schließlich wurde gezeigt, dass IL-10 in DCs und Makrophagen auch die Expression von IL-12, dem wichtigsten Induktor der T_H1 T-Zellantwort, inhibieren kann^{287,303}. Im Einklang mit diesen Studien sezernieren DCs aus IL-10ko Mäusen mehr IL-12 als DCs aus Wildtyp Mäusen²⁹⁶. Dies resultiert bei der Antigen-abhängigen Stimulation von CD4⁺ T-Zellen in

Anwesenheit von DCs aus IL-10ko Mäusen in einer verstärkten Produktion von IFN γ ³⁰⁴. In einer Studie von Shi *et al.* wurde beschrieben, dass T_H17 Zellen in Gegenwart des T_H1 polarisierenden Zytokins IL-12 *in vitro* Charakteristika von T_H1 Zellen annehmen können und sowohl IL-17 als auch IFN γ sezernieren³⁰⁵. Durch die gesteigerte Freisetzung von IL-12 könnte in IL-10ko Mäusen daher auch die IFN γ -Produktion in T_H17 Zellen gefördert werden. Die in IL-10ko Mäusen beobachtete verstärkte Expression von IL-23 und IL-1 β kann zudem die Synthese von GM-CSF durch T_H1 und/oder T_H17 Zellen steigern^{163,165,306,307}. Zusammenfassend kann IL-10 in Wildtyp Mäusen die Expression von MHC- und kostimulatorischen Molekülen in APCs modulieren sowie die Freisetzung von T_H1- und T_H17-fördernden Zytokinen in APCs supprimieren und so auf indirekte Weise die Differenzierung von T_H1 und T_H17 Zellen inhibieren.

T-Zellen exprimieren jedoch selbst ebenso den IL-10R, wodurch T-Zellen auch direkt auf IL-10 reagieren und durch dieses Zytokin reguliert werden können^{197,266}. Um einen direkten Einfluss von IL-10 auf T-Zellen nachzuweisen, wurden in der vorliegenden Arbeit CD4dnIL10R α Mäuse verwendet²⁶⁶. Durch Überexpression des dominant-negativen IL-10-Rezeptor α unter der Kontrolle des CD4 Promotors ist die IL-10 Signalgebung in diesen Tieren in CD4⁺ T-Zellen blockiert, während alle übrigen Zellen einschließlich APCs jedoch ebenso wie in Wildtyp Mäusen auf IL-10 reagieren können. In CD4dnIL10R α Mäusen konnte keine verstärkte Expansion von CD4⁺ T-Zellen in den Lymphknoten im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden (Abbildung 24C). Die in IL-10ko Mäusen beobachtete T-Zellexpansion von CD4⁺ T-Zellen ist daher wahrscheinlich überwiegend auf indirekte Wirkmechanismen zurückzuführen.

Durch Präzipitationsexperimente konnte gezeigt werden, dass der IL-10R auf T-Zellen mit CD28 assoziiert, und IL-10 die Signaltransduktion über CD28 und damit das wichtigste kostimulatorische T-Zellsignal inhibiert³⁰⁸. Tatsächlich kann IL-10 die Produktion von IL-2 und die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen bei Stimulation *in vitro* auch in Abwesenheit von APCs direkt hemmen^{293,309}. Die Inhibierung der Proliferation durch IL-10 konnte dabei jedoch durch Zugabe geringer Mengen IL-2 wieder aufgehoben werden²⁹³. *In vivo* könnte daher die IL-2 Produktion durch CD8⁺ T-Zellen, die in Wildtyp und CD4dnIL10R α Mäusen gleichermaßen expandierten (Abbildung 24D), ausreichend sein, um den inhibierenden Einfluss von IL-10 auf die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen in den Wildtyp Mäusen wieder aufzuheben.

Obwohl CD4⁺ T-Zellen in CD4dnIL10R α Mäusen nicht vermehrt expandierten, sezernierten T-Zellen dieser Mäuse nach Restimulation *in vitro* signifikant mehr IFN γ , IL-17 und GM-CSF im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 25). Anschließende durchflusszytometrische Analysen zeigten weiter, dass CD4dnIL10R α Mäuse im Vergleich zum Wildtyp sowohl mehr CD4⁺IFN γ ⁺ T-Zellen als auch CD4⁺IL-17⁺ T-Zellen aufwiesen (Abbildung 26A, B). Auch CD4dnIL10R α Mäuse zeigten damit eine erhöhte Differenzierung zu proinflammatorischen

T_H1 und T_H17 Zellen, die jedoch im Vergleich mit IL-10ko Mäusen schwächer ausgeprägt war (Abbildung 26A, B).

Neben der Hemmung der IL-2-Produktion wurde bereits gezeigt, dass IL-10 durch direkten Einfluss auf T-Zellen die Produktion von IFN γ inhibiert^{227,310}. Ob die IL-10-Signalgebung auch einen direkten Einfluss auf die IL-17-Produktion durch T_H17 Zellen hat, wird hingegen kontrovers diskutiert. Naundorf *et al.* konnten *in vitro* keinen direkten Einfluss von IL-10 auf die IL-17 Sekretion durch T-Zellen nachweisen³¹⁰. Im Gegensatz hierzu zeigte eine Studie von Huber *et al.*, dass IL-10 auch direkt die IL-17 Sekretion von CD4⁺ T-Zellen reguliert²²⁷.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die spezifische Blockade der IL-10 Signalgebung in T-Zellen die Differenzierung zu T_H1 und T_H17 Zellen fördert und legen eine direkte inhibitorische Wirkung von IL-10 nahe, die zusätzlich durch indirekte Wirkmechanismen wie die Modulation der Expression von MHCII, kostimulatorischen Molekülen und proinflammatorischen Zytokinen (IL-12, IL-1 β , IL-6) unterstützt wird.

4.2.2 IL-10 inhibiert die Migration und Akkumulation proinflammatorischer T-Zellen in der Leber

In der Leber von IL-10ko Mäusen wurde im Vergleich mit Wildtyp Mäusen eine erhöhte Akkumulation von CD3⁺ T-Zellen detektiert (Abbildung 6A). Dabei waren sowohl erhöhte Zahlen von CD4⁺ T-Zellen als auch von CD8⁺ T-Zellen nachweisbar (Abbildung 6B, C). Übereinstimmend hiermit wurde in aktuellen Studien beschrieben, dass IL-10 die Akkumulation aktivierter CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Leber supprimieren kann^{220,311}. Wie genau IL-10 dies vermittelt, ist jedoch noch unklar. In IL-10ko Mäusen, die Autoantigen-spezifisch mit SepSecS oder Autoantigen-unspezifisch immunisiert wurden, konnten ähnliche T-Zellzahlen nachgewiesen werden, und auch CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Zellen waren zu gleichen Anteilen in den Lebern detektierbar. Dies lässt vermuten, dass die Leberentzündung in den IL-10ko Mäusen primär durch unspezifische, Antigen-unabhängige Migration und Akkumulation von T-Zellen in die Leber hervorgerufen wurde. Da die Migration von T-Zellen in die Leber durch Chemokine initiiert wird⁵⁸ (s. Abschnitt 1.2), wurde untersucht, ob die verstärkte Migration von T-Zellen in die Lebern der IL-10ko Mäuse auf einer veränderten Expression von Chemokinen beruht.

In verschiedenen Studien wurde beschrieben, dass die Expression des Chemokinrezeptors CXCR-3 auf intrahepatischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Effektorzellen und seiner Liganden CXCL-9, CXCL-10 und CXCL-11 in chronischen Hepatitiden stark ansteigt und mit dem Schweregrad der Entzündung korreliert^{74-83,312}. Die erhöhte Expression von CXCR-3 Liganden scheint charakteristisch für viele chronische Lebererkrankungen zu sein, weshalb angenommen wird, dass sie eine universelle Rolle bei der Rekrutierung von T-Zellen in die entzündete Leber einnehmen⁵⁶. In Adhäsionsexperimenten wurde gezeigt, dass die Chemokine CXCL-9,

CXCL-10 und CXCL-11 für die Adhäsion und Transmigration von T-Zellen durch das hepatische Endothel von entscheidender Bedeutung sind⁷⁴. CXCR-3 Liganden können vom sinusoidalen Endothel selber oder von benachbarten Zellen exprimiert werden und dann durch sinusoidale Endothelzellen aufgenommen und auf die luminalen Oberfläche der Endothelzellen transloziert werden^{74,313}. Zudem wurde beschrieben, dass die Expression der CXCR-3 Liganden auf dem hepatischen Endothel bei chronischen Hepatitiden in Bereichen der T-Zellinfiltration stark ansteigt und ihre Anwesenheit mit dem Schweregrad der hepatischen Entzündung korreliert⁷⁵. Während die Expression von CXCR-3 auf naiven T-Zellen nicht nachgewiesen werden kann, exprimieren T-Effektorzellen verstärkt CXCR-3³¹⁴, wodurch sie in Anwesenheit von CXCR-3 Liganden durch das sinusoidale Endothel in die Leber migrieren können. Der fehlende Einfluss von IL-10 führte in IL-10ko Mäusen zu einer signifikant erhöhten hepatischen Expression von CXCR-3 und seiner Liganden CXCL-9, CXCL-10 und CXCL-11 im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 7A-D). CXCL-9, CXCL-10 und CXCL-11 werden von Monozyten/Makrophagen, Neutrophilen, Hepatozyten und LSECs nach Stimulation mit IFN γ sezerniert³¹⁵⁻³¹⁸. Die erhöhte Expression der CXCR-3 Liganden in den IL-10ko Mäusen beruht daher vermutlich auf der verstärkten Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IFN γ , die initial von aktivierten intrahepatischen Makrophagen und Neutrophilen sezerniert werden^{75,82,319}, im Zuge von Entzündungen aber auch von T_H1 Zellen und zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen. IL-10 kann wiederum die LPS-induzierte Synthese von IFN γ und TNF α durch Makrophagen und Neutrophile inhibieren^{197,320}, wodurch IL-10 die hepatische Expression von CXCR-3 Liganden wie auch die Rekrutierung CXCR-3 positiver T-Effektorzellen in die Leber hemmen kann.

CCR-5 ist ein weiterer Chemokinrezeptor, der von aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, insbesondere in großen Mengen von T_H1 Zellen exprimiert wird^{56,88,270,321}, jedoch nicht von naiven T-Zellen. So reagieren naive T-Zellen in chemotaktischen Tests nicht mit den CCR-5 Liganden CCL-2, CCL-3 und CCL-5^{322,323}. In der Leber scheinen T_H1 Zellen CCR-5 und CXCR-3 für die Migration und Akkumulation in den Portalfeldern der entzündeten Leber zu nutzen⁶⁷. Außerdem wurde gezeigt, dass die erhöhte intrahepatische Zellzahl CXCR-3⁺CCR-5⁺ T-Zellen mit verstärkter hepatischer Entzündung korreliert⁷⁹. In vergleichenden Analysen der CCR-5 Expression in IL-10ko gegenüber Wildtyp Mäusen konnte eine signifikant erhöhte Expression von CCR-5 nachgewiesen werden (Abbildung 7E). Dies deutete auf eine verstärkte Migration und Akkumulation insbesondere von T_H1 Zellen und auch von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen in den portalen Regionen der Leber in den IL-10ko Mäusen hin. Ob auch die CCR-5 Liganden verstärkt in den Lebern der IL-10ko Mäuse exprimiert werden, wird in weiterführenden Studien untersucht. Beschrieben wurde bereits, dass Cholangiozyten nach *in vitro* Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen wie IFN γ

verstärkt die CCR-5 Liganden CCL-2 und CCL-5 exprimieren^{55,324}. Zudem kann IL-10 *in vitro* die Produktion von CCR-5 Liganden durch DCs und Makrophagen inhibieren²⁸¹.

Um zu verstehen, welche T-Zellen bei fehlender IL-10 Signalgebung in die Lebern migriert sind, wurde zunächst die Zytokinproduktion intrahepatischer Leukozyten aus IL-10ko und Wildtyp Mäusen nach Antigen-unspezifischer Stimulation mittels *Cytokine-Bead-Array* in unserer Arbeitsgruppe gemessen. Hierbei zeigte sich der größte Unterschied in der Sekretion der Zytokine IFN γ , IL-17 und GM-CSF. In weiteren Analysen dieser Arbeit konnte dies bestätigt werden. Hierbei sezernierten die mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern restimulierten Leberlymphozyten der IL-10ko Mäuse, unabhängig von der Autoantigen-spezifischen oder Autoantigen-unspezifischen Immunisierung, signifikant mehr IFN γ , IL-17 und GM-CSF im Vergleich zu denen der C57Bl/6 Wildtyp Mäuse (Abbildung 8). Die genauere Analyse der T-Zellen zeigte, dass sowohl signifikant mehr IFN γ -produzierende CD8⁺T-Zellen als auch CD4⁺T-Zellen in die Lebern der IL-10ko Mäuse migrierten (Abbildung 9A, Abbildung 10A). T_{H1} Zellen sind neben der Sekretion von IFN γ zudem durch die Expression des T_{H1}-spezifischen Transkriptionsfaktors Tbet charakterisiert^{95,97}. Auch in vergleichenden Expressionsanalysen in IL-10ko und Wildtyp Mäusen konnten Unterschiede in der Tbet-Expression nachgewiesen werden. Hierbei zeigten IL-10ko Mäuse eine signifikant gesteigerte intrahepatische Tbet-Expression im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 11B). Demnach akkumulierten bei IL-10-Defizienz sowohl vermehrt zytotoxische CD8⁺T-Zellen als auch T_{H1} Zellen in der Leber im Vergleich zum Wildtyp. Diese Beobachtung korreliert mit der in den IL-10ko Mäusen gesteigerten Expression der Chemokine CXCR-3 und CCR-5.

In IL-10ko Mäusen sezernierten 23.9 % der CD4⁺T-Zellen IL-17, in den Wildtyp C57Bl/6 Mäusen waren es mit 0.2 % bedeutend weniger (Abbildung 10B). T_{H17} Zellen sind neben der Sekretion von IL-17 durch die Expression des Transkriptionsfaktors ROR γ t charakterisiert³²⁵. Eine erhöhte intrahepatische Expression von ROR γ t wurde in IL-10ko Mäusen im Vergleich mit Wildtyp Mäusen beobachtet und steht im Einklang mit der erhöhten Akkumulation von T_{H17} Zellen in der Leber (Abbildung 11A). Neben T_{H1} Zellen migrieren und akkumulieren also auch T_{H17} Zellen bei IL-10-Defizienz verstärkt in der Leber. Die Frequenz intrahepatischer IL-17⁺CD8⁺T-Zellen (Tc17 Zellen) war hingegen in Wildtyp wie auch IL-10ko Mäusen mit 0.2 % gering und der fehlende Einfluss von IL-10 führte nicht zu einer verstärkten Akkumulation von Tc17 Zellen in der Leber (Abbildung 9B).

T_{H17} Zellen können über die Interaktion von CXCR-3 und der CXCR-3 Liganden CXCL-9-11 über das sinusoidale Epithel in die Leber migrieren⁹¹, deren Expression bei fehlender IL-10 Signalgebung verstärkt wird. Die Akkumulation von T_{H17} Zellen in den Portalfeldern der Leber scheint über die Interaktion von CCL-20 mit dem Chemokinrezeptor CCR-6, der auf aktivierten T_{H17} Zellen im Gegensatz zu T_{H1} und T_{H2} Zellen in großen Mengen exprimiert

wird^{326,327}, zu erfolgen. So wurde beschrieben, dass intrahepatische T_H17 Zellen sowohl CXCR-3 als auch CCR-6 in großen Mengen exprimieren und CCL-20-abhängig in die Portalfelder der entzündeten Leber bei AIH- und PBC-Patienten migrieren⁹¹. Daher wurde untersucht, ob IL-10 die hepatische Expression von CCL-20 reguliert und so die Akkumulation von CCR-6⁺ Zellen in der Leber inhibiert. Hierbei zeigte sich, dass sowohl die Expression von CCL-20 als auch von CCR-6 in den Lebern der IL-10ko Mäuse im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht war (Abbildung 7F, G). Diese Beobachtung korreliert mit der erhöhten intrahepatischen Akkumulation von T_H17 Zellen bei IL-10-Defizienz. Die Expression von CCL-20 konnte u.a. in Neutrophilen, aktivierten Makrophagen und biliären Epithelzellen (BECs, *biliary epithelial cells*) nachgewiesen werden³²⁸. *In vitro* kann IL-10 die Expression von CCL-20 in Makrophagen und Neutrophilen inhibieren^{329,330}. Da Neutrophile und Makrophagen einen großen Teil der leberinfiltrierenden Leukozyten in den IL-10ko Mäusen ausmachten (Abbildung 5C, D), könnte der fehlende Einfluss von IL-10 auf Neutrophile und Makrophagen somit zu einer verstärkten intrahepatischen Expression von CCL-20 in den IL-10ko Mäusen beitragen. Durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β kann zudem die CCL-20 Sekretion von BECs *in vitro* verstärkt werden⁹¹. Daher wurde auch die hepatische Expression von IL-1 β in vergleichenden Analysen in IL-10ko und Wildtyp Mäusen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Expression von IL-1 β bei fehlender IL-10 Signalgebung signifikant erhöht war (Abbildung 13C). Die Hauptproduzenten von IL-1 β sind aktivierte myeloide Zellen wie Granulozyten, Monozyten und Makrophagen. In diesen Zellen wird die Expression von IL-1 β *in vitro* durch IL-10 stark herunterreguliert^{224,331}. Durch seinen inhibierenden Einfluss auf Granulozyten und Makrophagen kann IL-10 somit auch indirekt die CCL-20 Expression durch BECs regulieren. Auch die proinflammatorischen Zytokine IFN γ und IL-17, die bei IL-10-Defizienz von intrahepatischen CD8⁺ T-Zellen, T_H1 und T_H17 Zellen nach Restimulation verstärkt sezerniert wurden, können die Sekretion von CCL-20 durch BECs weiter verstärken⁹¹. Auf diese Weise entsteht eine positive Rückkopplung, die zur weiteren Rekrutierung von CCR-6⁺ T-Zellen in die Portalfelder der Leber beitragen kann. In der Leber von IL-10ko Mäusen wurden sowohl unspezifische als auch autoreaktive CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen. Hierbei sezernierten CD4⁺ T-Zellen SepSecS-immunisierter Mäuse bei Antigen-abhängiger Restimulation *in vitro* gegenüber intrahepatischen CD4⁺ T-Zellen CFA-immunisierter IL-10ko Mäuse vermehrt IFN γ , IL-17 und GM-CSF und wiesen damit ein distinktes T_H1 und T_H17 Zytokinprofil auf (Abbildung 12). Der Anteil von CD4⁺ T-Zellen in der Leber von IL-10ko Mäusen war jedoch bei Immunisierung mit SepSecS in CFA oder PBS in CFA insgesamt vergleichbar. Darüber hinaus waren nach polyklonaler T-Zellspezifischer Restimulation der Leberlymphozyten keine signifikanten Unterschiede in der Sekretion der Zytokine IFN γ , IL-17 und GM-CSF in beiden Immunisierungsgruppen detektierbar. Eine Expansion von Autoantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in der Leber ist

daher unwahrscheinlich. Für die Aktivierung intrahepatischer autoreaktiver T-Zellen scheinen deshalb weitere Mechanismen erforderlich zu sein. Zusammenfassend zeigten die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, dass IL-10 die Migration und Akkumulation Autoantigen-spezifischer und Autoantigen-unspezifischer T_H1 und T_H17 Zellen in die Leber durch Suppression der hepatischen Chemokinexpression reguliert.

Die spezifische Blockade der IL-10 Signalgebung in $CD4^+$ T-Zellen führte nach Autoantigen-spezifischer und Autoantigen-unspezifischer Immunisierung der $CD4dnIL-10R\alpha$ Mäuse ebenfalls zur Generierung einer Hepatitis, die durch portale und periportale Infiltrate charakterisiert war (Abbildung 19A, B). Die histologische Beurteilung nach dem mHAI-Score spiegelte eine signifikant erhöhte hepatische Entzündungsaktivität in den $CD4dnIL-10R\alpha$ Mäusen im Vergleich zum Wildtyp wieder, die allerdings geringer eingestuft wurde im Vergleich zur Hepatitis in IL-10ko Mäusen (Abbildung 3, Abbildung 19E). Nach unspezifischer Immunisierung mit CFA waren in den Lebern der $CD4dnIL-10R\alpha$ Mäuse zudem mehr Leukozyten und $CD3^+$ T-Zellen als in Wildtyp Mäusen nachweisbar, darunter mehr $CD4^+$ T-Zellen (Abbildung 4, 6, 19, 20). Die intrahepatische Anzahl von $CD8^+$ T-Zellen wurde durch Immunisierung der $CD4dnIL-10R\alpha$ Mäuse allerdings nicht beeinflusst (Abbildung 20C), so dass vornehmlich $CD4^+$ T-Zellen Antigen-unspezifisch in die Leber migrierten und dort akkumulierten. Diese Daten stehen im Einklang mit Studien, welche die generell verstärkte Migration aktivierter T-Zellen in die Leber beschreiben^{279,280,332}. Im Gegensatz zu IL-10ko Mäusen wiesen die Lebern von $CD4dnIL-10R\alpha$ Mäusen gegenüber Wildtyp Tieren keine erhöhte Expression der hepatischen CXCR-3-Chemokinliganden CXCL-9-11 oder CCL-20 auf (Abbildung 21B-D,G). Jedoch war die hepatische Expression von CXCR-3 und CCR-5, die T_H1 Zellen für die Migration und Akkumulation in die Portalfelder der Leber nutzen⁶⁷, in $CD4dnIL-10R\alpha$ Mäusen im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht (Abbildung 21A, E). In einer Studie von Crane *et al.* wurde beschrieben, dass die Expression von CCR-5 auf *in vitro* polarisierten T_H1 Zellen stark hochreguliert wird³³³. Der adoptive Transfer dieser Zellen führte zur Infiltration in die Retina in einem Modell der experimentellen autoimmunen Uveitis (EAU). Die Behandlung der T_H1 Zellen mit einem Antikörper gegen CCR-5 vor Transfer führte hingegen zur verminderten Infiltration der T_H1 Zellen am Entzündungsort. Die gesteigerte CCR-5 Expression war daher ein Indiz für eine verstärkte Infiltration von T_H1 Zellen in die Lebern der $CD4dnIL-10R\alpha$ Mäuse. Deshalb wurde weiter untersucht, welches Zytokinprofil die hepatischen T-Zellen der $CD4dnIL-10R\alpha$ Mäuse aufweisen. Hierbei sezernierten T-Zellen der $CD4dnIL10R\alpha$ Mäuse ebenfalls signifikant mehr IFN γ , IL-17 und GM-CSF im Vergleich zum Wildtyp und zeigten hierdurch ein distinktes T_H1 und T_H17 Zytokinprofil (Abbildung 22). Dies wurde ebenso in einem Kolitismodell beschrieben, bei dem die Behandlung der $CD4dnIL-10R\alpha$ Mäuse mit einem anti-CD3 Antikörper zum selektiven Anstieg IFN γ - und IL-17-produzierender $CD4^+$ T-Zellen

im Darm führte²²⁷. Die Migration der CD4⁺ T-Zellen wird in CD4dnIL-10R α Mäuse nicht durch einen erhöhten Chemokingradienten zur Leber hin gesteuert und lässt vermuten, dass IL-10 die Expression von Adhäsionsmolekülen auf T-Zellen reguliert. Interaktionen zwischen endothelialen Adhäsionsmolekülen und ihren von T-Zellen exprimierten Liganden führen zur festen Adhäsion der T-Zellen an Endothelien und stellen einen entscheidenden Schritt bei der Extravasation von T-Zellen in periphere Gewebe dar^{334,335}. Die vermehrte Infiltration der CD4⁺ T-Zellen in die Lebern der CD4dnIL-10R α Mäuse beruht vermutlich auch auf einer veränderten Expression von Adhäsionsmolekülen, über die T-Zellen mit LSECs interagieren. LSECs exprimieren konstitutiv die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und VAP-1^{65,66,73,336}. Eine verstärkte Adhäsion und Transmigration der CD4⁺ T-Zellen könnte auf einer durch die fehlende IL-10-Signalgebung erhöhten Expression der Integrine $\alpha 4\beta 7$ und $\alpha 4\beta 1$, LFA-1 oder den bisher unbekanntem Liganden für VAP-1 begründet liegen, über die die Interaktion von T-Zellen und LSECs durch Bindung an VCAM-1, ICAM-1 bzw. VAP-1 vermittelt werden. So sind LFA-1-defiziente Mäuse resistenter gegenüber LPS-induzierter Leberentzündung als heterozygote LFA-1^{+/-} Mäuse, in denen die T-Zellmigration in die Leber reduziert ist³³⁷. Die Behandlung mit einem monoklonalen Antikörper gegen den LFA-1 Liganden ICAM-1 führt ebenso zur Reduktion von Leberentzündungen⁵⁸. Zudem wurde beschrieben, dass *in vitro* generierte T_H1 wie auch T_H17 Zellen große Mengen LFA-1 exprimieren³³⁸, wodurch sie verstärkt an ICAM-1 auf dem sinusoidalen Endothel adhären können. Im Modell der ConA-induzierten Hepatitis nutzen CD4⁺ T-Zellen das Integrin $\alpha 4\beta 1$ zur Akkumulation in der Leber³³⁹. So führte die Behandlung mit einem Antikörper gegen $\alpha 4\beta 1$ zur Reduktion der hepatischen CD4⁺ T-Zellzahl.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen zeigen, dass die IL-10 Signalgebung in T-Zellen nicht nur die Differenzierung zu T_H1 und T_H17 Zellen direkt hemmen kann, sondern ebenfalls auf direkte Weise auch die Infiltration proinflammatorischer T-Zellen in die Leber, möglicherweise durch Steuerung der Expression von Adhäsionsmolekülen. Daher soll in weiterführenden Analysen untersucht werden, ob IL-10 die Expression von Adhäsionsmolekülen, die die Adhäsion an das sinusoidale Endothel verstärken, auf T-Zellen inhibiert und so die Migration proinflammatorischer T-Zellen in die Leber supprimiert.

4.2.3 IL-10 reguliert das intrahepatische Zytokinmilieu, wodurch intrahepatische T_H1 und T_H17 Antworten inhibiert werden können

In AIH-Patienten konnte im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine signifikant erhöhte intrahepatische Expression von IL-17, ROR γ t, IL-6 und IL-1 β nachgewiesen werden, welche mit verstärkter Entzündung und Fibrose korreliert¹⁴⁶. In initialen Studien mit IL-1R-defizienten Mäusen wurde beschrieben, dass IL-1 β eine bedeutende Rolle bei experimentellen autoimmunen Erkrankungen wie der EAE einnimmt³⁴⁰. So entwickeln diese Mäuse im

Vergleich zum Wildtyp seltener eine EAE³⁴¹. In nachfolgenden Studien wurde beschrieben, dass IL-1 β zusammen mit IL-6 und TGF β die Differenzierung zu T_H17 Zellen fördert¹⁵⁰. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob IL-10 neben IL-1 β auch die hepatische Expression von IL-6 und TGF β reguliert und hierdurch die Konversion zu T_H17 Zellen bei fehlender IL-10-Signalgebung gefördert wird. IL-10ko Mäuse wiesen eine signifikant erhöhte intrahepatische Expression von IL-1 β , IL-6 und TGF β im Vergleich mit Wildtyp Mäusen auf (Abbildung 13A-C). Übereinstimmend hiermit wurde beschrieben, dass IL-10 die Expression von IL-6 in myeloiden Zellen, den Hauptproduzenten dieses Zytokins, inhibieren kann^{224,331}. Durch Regulation der IL-6, IL-1 β und TGF β Expression kann IL-10 in Wildtyp Mäusen zur verminderten Konversion zu T_H17 Zellen bzw. zum Verlust des T_H17 Phänotyps beitragen. Gleichzeitig scheint IL-17 die IL-6-Produktion von Hepatozyten sowie die IL-6- und IL-1-Produktion von myeloiden Zellen zu forcieren^{146,342,343}. Diese positive Rückkopplung kann zu einer gesteigerten Bildung von T_H17 Zellen in IL-10ko Mäusen beitragen.

Neben IL-1 β , IL-6 und TGF β war in der Leber von IL-10ko Mäusen im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls eine signifikant gesteigerte Expression von IL-23 detektierbar (Abbildung 13D), wie sie auch bei AIH-Patienten im Vergleich zu Gesundkontrollen beobachtet wird¹⁴⁶. Dieses Zytokin wird primär von APCs nach Erkennung von PAMPs sezerniert^{344,345}. Auch bei Entzündungen der Leber, die mit erhöhten T_H17 Antworten assoziiert sind, wurden DCs und Makrophagen als eine der Hauptquellen der IL-23-Produktion beschrieben³⁴⁶. IL-23 scheint ebenfalls an der Pathogenese von Organ-spezifischen autoimmunen Erkrankungen beteiligt zu sein. So sind IL-23-defiziente Mäuse vor der Induktion von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED), der EAE und der Kollagen-induzierten Arthritis geschützt³⁴⁷⁻³⁴⁹, was die Rolle von IL-23 bei autoimmunen Pathologien verdeutlicht. Hierbei korreliert die Resistenz der IL-23-defizienten Mäuse gegenüber der Induktion autoimmuner Pathologien mit Defekten in der IL-17-Expression durch T_H17 Zellen^{347,350}. Naive T-Zellen exprimieren den IL-23R nicht, so dass IL-23 die Differenzierung zu T_H17 Zellen nicht zu induzieren scheint; vielmehr wird angenommen, dass IL-23 die Expansion von T_H17 Zellen und/oder die Stabilisierung des T_H17 Phänotyps begünstigt^{150,272,351}. In *in vitro* Studien wurde gezeigt, dass IL-10 die Expression von IL-23 in DCs und Makrophagen inhibiert,²¹² wodurch IL-10 in Wildtyp Mäusen die hepatische Expression von IL-23 hemmen kann.

GM-CSF, das von intrahepatischen T-Zellen der IL-10ko Mäuse nach Restimulation verstärkt sezerniert wurde (Abbildung 8C, Abbildung 12C), ist ein proinflammatorisches Zytokin, das die Aktivierung, Reifung und Differenzierung von Makrophagen, Granulozyten und DCs induziert, die essentiell für die Initiation und Aufrechterhaltung von Zell-vermittelten Immunantworten sind³⁵²⁻³⁵⁴. Die Bedeutung von GM-CSF bei autoimmunen Erkrankungen wurde in experimentellen Modellen in GM-CSF-defizienten Mäusen untersucht. So

entwickeln GM-CSF-defiziente Mäuse keine autoimmunen inflammatorischen Erkrankungen wie die EAE, die Myokarditis und die Kollagen-induzierte Arthritis³⁵⁵⁻³⁵⁷. In den letzten Jahren rückte das Zytokin GM-CSF in Bezug auf T_H17 Zellen in den Mittelpunkt des Interesses, da es mit einer gesteigerten Pathogenität dieser Zellen assoziiert wurde^{163,164}. In Studien von El Behi *et al.* und Codarri *et al.* wurde im EAE-Modell der autoimmunen Erkrankung Multiple Skleose gezeigt, dass die Produktion von GM-CSF entscheidend für die inflammatorischen Eigenschaften von T_H17 Zellen zu sein scheint^{163,164}. Zudem wurde beschrieben, dass IL-23 die Produktion von GM-CSF in T-Zellen fördert und die Neutralisierung von GM-CSF in diesem Modell die Entwicklung der Entzündung hemmt. Codarri *et al.* zeigten außerdem, dass auch T_H1 Zellen im EAE-Modell verstärkt GM-CSF produzieren und dies ebenso entscheidend für ihre inflammatorischen Eigenschaften zu sein scheint. Die Expression von GM-CSF kann in T_H1 und T_H17 Zellen durch IL-23 und IL-1 β gesteigert werden^{163,165,306,307}. Die Inhibition der IL-1 β und IL-23 Expression durch IL-10 kann sich deshalb supprimierend auf die GM-CSF-Produktion intrahepatischer T-Zellen auswirken. Die Rolle von GM-CSF bei Lebererkrankungen ist bisher wenig untersucht. In einer Studie von Al-Wabel *et al.* konnten jedoch im Serum von Patienten mit autoimmunen Lebererkrankungen und hepatozellulären Karzinomen erhöhte GM-CSF-Mengen nachgewiesen werden³⁵⁸.

Bei den vorliegenden Untersuchungen konnte jedoch nicht geklärt werden, ob T_H1 oder T_H17 Zellen in IL-10ko Mäusen für die erhöhte GM-CSF Produktion verantwortlich sind, da GM-CSF in durchflusszytometrischen Analysen nicht nachgewiesen werden konnte. Zurzeit sind lediglich Antikörper für GM-CSF erhältlich, die auch für den Nachweis im ELISA verwendet werden. GM-CSF wird als glykosyliertes Protein sezerniert und kann in der Zelle vermutlich nicht in dieser Form nachgewiesen werden²⁷¹. Ein weiteres Kriterium stellen die Stimulationsbedingungen dar, die ggf. für den Nachweis von GM-CSF weiter optimiert werden müssen. Da sowohl die hepatische Expression von IL-1 β als auch von IL-23 in AIH-Patienten erhöht ist, soll in weiteren Studien in Leberbiopsien untersucht werden, ob GM-CSF in intrahepatischen T-Zellen nachweisbar ist, um den Pathomechanismus der AIH weiter aufzuklären.

Interessanterweise konnten in den IL-10ko Mäusen zudem signifikant mehr T_H1/T_H17-Zellen nachgewiesen werden als in Wildtypmäusen, die sowohl IFN γ als auch IL-17 ko-produzierten (Abbildung 10C). T_H1/T_H17 Zellen sind in den IL-10ko Mäusen eine der Hauptquellen von IL-17, da mehr als die Hälfte der IL-17 produzierenden CD4⁺ T-Zellen auch IFN γ produzierten. T_H1/T_H17 Zellen wurden bisher vornehmlich in Bezug auf chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) beschrieben, wobei ihnen eine pathogene Rolle zugesprochen wird^{172,227}. Durch die fehlende Signalgebung von IL-10 in IL-10ko Mäusen könnte die Konversion zu pathogenen T_H1/T_H17 Zellen gefördert werden. So ist beschrieben, dass IFN γ die Expression des IL-12 Rezeptors auf T_H17 Zellen induzieren kann und

hierdurch die Suszeptibilität von T_H17 Zellen für die Aktivität von IL-12 beeinflusst³⁵⁹. *In vitro* führt die Zugabe von IL-10 zur Reduktion der IL-12 Sekretion von Monozyten/Makrophagen und DCs^{201,360}. Auch *in vivo* inhibiert IL-10 die Ausschüttung von IL-12. So führte die Neutralisierung von IL-10 im ConA-induzierten Hepatitis-Modell zur Zunahme der IL-12-Konzentration im Serum, die Behandlung mit IL-10 jedoch zur Abnahme der IL-12 Expression²¹⁸. Auch nach Infektion von IL-10ko Mäusen mit *Toxoplasma gondii* wurden im Serum der IL-10ko Mäuse erhöhte IL-12 Konzentrationen im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen²⁷⁵. Zudem wurde beschrieben, dass T_H17 Zellen in Gegenwart des T_H1 polarisierenden Zytokins IL-12 Charakteristika von T_H1 Zellen annehmen können und sowohl IL-17 als auch IFN γ sezernieren³⁰⁵. IL-10 könnte demnach durch Inhibierung der IL-12 Sekretion die Konversion von T_H17 Zellen zu T_H1/T_H17 Zellen hemmen.

Bei Entzündungen der Leber steigt zudem die lokale Expression von MHCII und kostimulatorischer Moleküle in der Leber stark an (s. Abschnitt 1.1.2). Ebenso wurde in Patienten mit autoimmunen Lebererkrankungen ein Anstieg der intrahepatischen MHCII-Expression beschrieben³⁶¹. IL-10 kann wiederum die antigenpräsentierenden Eigenschaften intrahepatischer APC-Populationen supprimieren. So wurde beschrieben, dass IL-10 sowohl die Rezeptor-vermittelte Antigenaufnahme als auch die Expression von MHCII-Molekülen und der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 in KCs und LSECs inhibiert^{222,362}. Zusätzlich supprimiert IL-10 *in vitro* in weiteren Makrophagenpopulationen und DCs die konstitutive und IFN γ -induzierte Expression von MHCII und kostimulatorischen Molekülen (CD80 und CD86)³⁶³⁻³⁶⁵. Der fehlende Einfluss von IL-10 auf intrahepatische APC-Populationen führte auch in IL-10ko Mäusen zu einer signifikant erhöhten Expression von MHCII und des kostimulatorischen Moleküls CD80 in den IL-10ko Mäusen im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 14B, C). Dies könnte zusätzlich zu einer verstärkten Aktivierung intrahepatischer CD4⁺ T-Zellen führen und zu einer verstärkten Zytokinsekretion durch T_H1, T_H17 und T_H1/T_H17 Zellen. Zudem können aktivierte DCs aus der Leber vermehrt in die regionalen sekundären lymphatischen Organe wie Milz und Lymphknoten migrieren und hier naive T-Zellen aktivieren, die wiederum durch den erhöhten Chemokingradienten in IL-10ko Mäusen zur Leber rekrutiert werden und die Hepatitis weiter verstärken.

Zusammenfassend entsteht in Abwesenheit von IL-10 ein Zytokinmilieu in der Leber, das die Bildung, Aktivierung und/oder Aufrechterhaltung von T_H1 und T_H17 Antworten begünstigt.

4.2.4 Rolle von IL-10, T_H1 und T_H17 Zellen bei der Ausbildung autoimmuner Pathologien

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass IL-10 die Differenzierung von T_H1 und T_H17 Zellen reguliert und die Migration und Akkumulation

pathogener Autoantigen-spezifischer und Autoantigen-unspezifischer T_H1 und T_H17 Zellen, sowie von $CD8^+$ T-Zellen in die Leber inhibiert.

AIH-Patienten weisen ein gemischtes hepatisches Infiltrat inflammatorischer Zellen auf, das von $CD4^+$ T-Zellen und $CD8^+$ T-Zellen dominiert wird. In immunhistochemischen Färbungen der Leberbiopsien von AIH-Patienten zeigt sich, dass $CD4^+$ T-Zellen im Portalfeld der entzündeten Lebern lokalisiert sind, während sich $CD8^+$ T-Zellen periportal und im Parenchym befinden^{246-248,366}. Sowohl $CD4^+$ T-Zellen als auch $CD8^+$ T-Zellen scheinen an der Pathogenese der AIH beteiligt zu sein^{246,248,367}. $CD8^+$ T-Zellen scheinen eine dominante Rolle insbesondere zu Beginn der Erkrankung und in Zeiten der höchsten Krankheitsaktivität zu spielen^{367,368}. Zudem wurde von Longhi et al. eine verstärkte Expression von IFN γ durch $CD8^+$ T-Zellen in Zeiten der höchsten Krankheitsaktivität beschrieben³⁶⁹. In Bezug auf $CD4^+$ T-Zellen wird vermutet, dass sie die hauptsächlich gewebeschädigende Effektorpopulation in der Leber von AIH-Patienten darstellen^{114,121,370,371}. T_H1 Zellen scheinen hierbei sowohl bei der AIH und als auch bei weiteren autoimmunen Lebererkrankungen die dominierende Population leberinfiltrierender $CD4^+$ T-Zellen auszumachen^{121,123,124,372}. Zudem sezernieren leberinfiltrierende T_H1 Zellen aus AIH Patienten verstärkt IFN γ ¹²¹. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass IL-10 sowohl die Differenzierung zu T_H1 Zellen als auch die Migration und Akkumulation IFN γ -produzierender T_H1 Zellen und $CD8^+$ T-Zellen in der Leber hemmt. Auf diese Weise kann IL-10 zur verminderten Progression autoimmuner Leberentzündungen beitragen. So wurde beispielsweise im EAE-Modell gezeigt, dass der Schweregrad der Erkrankung mit einer erhöhten IFN γ -Sekretion durch T_H1 Zellen im Zentralen Nervensystem, dem Zielorgan der Autoimmunreaktion, korreliert^{130,131}. Auch der adoptive Transfer Autoantigen-spezifischer IFN γ -produzierender $CD4^+$ T-Zellen führte zur Induktion der EAE¹³². IL-10-defiziente Mäuse entwickelten auch hier eine stärkere Erkrankung als Wildtyp Mäuse, während IL-10 transgene Mäuse vor der Induktion der EAE geschützt waren³⁷³. Im Modell der ConA-induzierten Hepatitis, in dem IFN γ -produzierende T-Zellen als entscheidende Mediatoren der Leberentzündung identifiziert wurden, hatte die Neutralisierung von IFN γ einen protektiven Einfluss auf die Entwicklung der Hepatitis^{374,375}. Ebenso führte die Blockade von IL-10 in diesem Modell zur Reduktion der Leberentzündung und zur Abnahme der IFN γ -Produktion^{217,374,376}.

T_H17 Zellen wurden mit einer Vielzahl autoimmuner und weiterer chronischer Leberentzündungen assoziiert³⁷⁷ und scheinen an der Pathogenese von T_H1 -vermittelten autoimmunen Lebererkrankungen wie der PBC und der AIH beteiligt zu sein¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. Ein Anstieg der intrahepatischen Zahl IL-17-produzierender Zellen wurde bei PBC-Patienten beobachtet¹⁴⁵. In AIH-Patienten konnte im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine signifikant erhöhte intrahepatische Expression von IL-6, IL-1 β , IL-23, IL-17 und ROR γ t, dem Haupttranskriptionsfaktor von T_H17 Zellen, nachgewiesen werden, welche positiv mit

verstärkter Entzündung und Fibrose korreliert¹⁴⁶. In autoimmunen Erkrankungen wie der CIA, der EAE und der T-Zellvermittelten Kolitis wurden IL-17 und T_H17 Zellen als entscheidende Entzündungsmediatoren identifiziert^{141,347,349,378}. So führte beispielsweise der adoptive Transfer Autoantigen-spezifischer T_H17 Zellen zur Induktion der EAE³⁷⁸. ROR γ t-defiziente Mäuse, in denen keine gewebeinfiltrierenden T_H17 Zellen nachgewiesen werden können, entwickeln hingegen schwächere experimentell-induzierte autoimmune Erkrankungen wie die EAE³²⁵. T_H17 Zellen weisen eine hohe Plastizität auf und können funktionelle Charakteristika von T_H1 Zellen annehmen, indem sie IL-17 und IFN γ ko-produzieren. Diese als hochpathogen beschriebenen T_H1/T_H17 Zellen wurden bei Patienten mit Morbus Crohn im Darm detektiert, und es wird vermutet, dass sie eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der intestinalen Entzündung in murinen Kolitismodellen einnehmen^{172,227}. In der Tat konnte in Transferversuchen, in denen *in vivo* differenzierte T_H17 als auch T_H1/T_H17 Zellen in Empfängermäuse transferiert wurden, eine Kolitis induziert werden²²⁷. Die Behandlung mit rekombinantem IL-10 führte zur Reduktion der intestinalen Frequenz an T_H17 und T_H1/T_H17 Zellen. Auch im Mausmodell der autoimmunen Erkrankung Multiple Sklerose scheinen T_H1/T_H17 Zellen alleine in der Lage zu sein, eine EAE auszulösen^{173,175,379}.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass IL-10 eines der Hauptzytokine ist, das autoimmune Pathologien durch seine inhibierende Wirkung auf die Ausbildung von T_H1 und T_H17 Zellen und deren Migration und Akkumulation in der Leber hemmen kann.

4.3 Ausblick

IL-10 inhibiert die Differenzierung proinflammatorischer Autoantigen-spezifischer und Autoantigen-unspezifischer T_H1 und T_H17 Zellen und deren Migration in die Leber durch Regulation der intrahepatischen Chemokinexpression. In der Leber supprimiert IL-10 die Expression von IL-1 β und IL-23, die die GM-CSF-Produktion durch T_H1 und T_H17 Zellen steigern können^{163,165,306,307}. Da sowohl die hepatische Expression von IL-1 β als auch von IL-23 in AIH-Patienten erhöht ist¹⁴⁶, soll in weiteren Studien in Leberbiopsien untersucht werden, ob intrahepatische T-Zellen auch durch eine erhöhte GM-CSF-Produktion charakterisiert sind, um so die Pathogenese der AIH weiter aufklären zu können.

Da T_H1 Zellen die dominierende Population leberinfiltrierender T-Zellen bei AIH-Patienten ausmachen und vermutet wird, dass $CD4^+$ T-Zellen die hauptsächliche gewebeschädigende Effektorpopulation in der Leber darstellen^{114,121,370,371}, soll weiterführend untersucht werden, welche CCR-5 Liganden bei fehlender IL-10-Signalgebung verstärkt exprimiert werden. CCL-3 und CCL-5 sind nicht ausschließlich Liganden für CCR-5, sondern ebenso für CCR-1⁵⁶, der neben CXCR-3 und CXCR-6 auch auf NKT-Zellen exprimiert wird³⁸⁰. Diese Zellen scheinen ebenfalls an der Pathogenese autoimmuner Lebererkrankungen wie der PBC beteiligt zu sein³⁸¹. In der Leber exprimieren NKT-Zellen den Chemokinrezeptor CXCR-6, das Integrin LFA-1 und den Transkriptionsregulator Id2³⁸² und sezernieren nach Stimulation große Mengen an IFN γ , IL-4 und GM-CSF, aber auch andere Zytokine und Chemokine und könnten so zur Entzündungsreaktion in der Leber beitragen^{381,383}. NKT-Zellen exprimieren neben dem NK-Zell-Marker NK1.1 auch $CD3^{384}$ und könnten sich damit in der hepatischen $CD3^+$ T-Zellpopulation verbergen, von denen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen lediglich 20 % in den IL-10 α Mäusen ausmachten. Daher soll in diesem Modell untersucht werden, ob IL-10 auch die Aktivierung, Migration und Akkumulation von NKT-Zellen in die Leber reguliert.

Die spezifische Blockade der IL-10-Signalgebung in $CD4^+$ T-Zellen führte in $CD4dnIL-10R\alpha$ Mäusen ebenso zur Antigen-unspezifischen Migration und Akkumulation von $CD4^+$ T-Zellen in der Leber. Intrahepatische T-Zellen wiesen hierbei durch Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IFN γ , IL-17 und GM-CSF ein distinktes T_H1 und T_H17 Zytokinprofil auf. Diesbezüglich soll weiterführend mittels durchflusszytometrischer Analysen untersucht werden, ob die erhöhte Zytokinproduktion durch T_H1 und T_H17 Zellen erfolgte und mittels qPCR-Analysen zusätzlich die Expression der T_H1 - und T_H17 -spezifischen Transkriptionsfaktoren Tbet und ROR γ t untersucht werden. Die verstärkte Migration der $CD4^+$ T-Zellen wird in $CD4dnIL-10R\alpha$ Mäusen nicht durch einen erhöhten Chemokingradienten zur Leber hin gesteuert und lässt vermuten, dass IL-10 die Expression von Adhäsionsmolekülen auf T-Zellen reguliert. Daher soll vergleichend auf

proinflammatorischen CD4⁺ T-Zellen der Wildtyp, IL-10ko und CD4dnIL-10R α Mäuse die Expression der Integrine α 4 β 7, α 4 β 1 und LFA-1 untersucht werden, über die die Interaktion von T-Zellen mit LSECs durch Bindung an VCAM-1 und ICAM-1 vermittelt werden. Zusätzlich soll analysiert werden, ob IL-10 die Expression von VCAM-1 und ICAM-1 auf LSECs reguliert und hierdurch zusätzlich die Adhäsion der T-Zellen an das sinusoidale Endothel beeinflusst.

In IL-10ko Mäusen scheinen autoreaktive CD4⁺ T-Zellen nicht expandiert und folglich in der Leber nicht aktiviert worden zu sein. Neben genetischen Faktoren, die zu Störungen der Immunregulation beitragen können, werden auch Umwelteinflüsse wie Infektionen in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen als Ursache angenommen³⁸⁵. In einem Tiermodell der EAE konnte gezeigt werden, dass Infektionen einen wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung der Erkrankung haben³⁸⁶. Mäuse, die transgen einen myelinspezifischen TCR exprimieren und genetisch so verändert sind, dass sie neben dem autoreaktiven TCR keine anderen TCR exprimieren, also alle T-Zellen spezifisch für das Autoantigen Myelin sind, entwickeln keine EAE, wenn sie unter Pathogen-freien Bedingungen gehalten werden. Werden sie jedoch in eine konventionelle nicht-Pathogen-freie Umgebung transferiert, erkranken die Mäuse an der EAE. Auch im ConA-Modell einer T-Zell-vermittelten Hepatitis scheinen Pathogene einen wesentlichen Einfluss auf die Leberschädigung zu haben³⁸⁷. Ein Mangel an Darmbakterien reduzierte die ConA-induzierte Leberschädigung, obwohl weder Veränderungen der intrahepatischen T-Zellzahl noch Störungen der T-Zellaktivierung nachgewiesen werden konnten. Bisher werden verschiedene Mechanismen diskutiert, wie Infektionen zur Aktivierung autoreaktiver T-Zellen beitragen können. Ein Mechanismus beruht auf der Aktivierung autoreaktiver T-Zellen durch virale oder bakterielle Epitope, die eine strukturelle Ähnlichkeit mit Selbst-Antigenen aufweisen (Molekulare Mimikry)³⁸⁸. Andererseits können durch einen vorausgegangenen Gewebeschaden, der entweder durch die antimikrobielle Immunantwort oder durch zytolytische Effekte des Pathogens verursacht wird, große Mengen an Autoantigenen freigesetzt werden³⁸⁹. Autoantigene, die durch den Gewebeschaden freigesetzt werden, können dann von APCs aufgenommen und autoreaktiven T-Zellen präsentiert werden, wodurch sie aktiviert werden³⁹⁰. Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden in IL-10ko Mäusen und Wildtyp Mäusen durchgeführt, die unter spezifisch Pathogen-freien Verhältnissen gehalten wurden. Weder Autoantigen-spezifisch und –unspezifisch immunisierte IL-10ko Mäuse zeigten dabei erhöhte Serumtransaminasen (Daten nicht gezeigt) und damit keine Gewebeschädigung der Leber. Die Präsentation von Autoantigenen ist daher womöglich gering. IL-10ko Mäuse entwickeln spontan eine Kolitis, wenn sie unter nicht-Pathogen-freien Bedingungen gehalten werden, und werden als Modell für CED genutzt^{391,392}. Durch eine Kolitis könnten pathogene Bakterien oder deren Antigene durch den entzündeten permeablen Darm verstärkt zur Leber

transloziert werden und zur Aktivierung autoreaktiver T-Zellen beitragen^{387,393}. So wurden auch Assoziationen autoimmuner Lebererkrankungen mit CED beschrieben. Etwa 60-70 % der PSC-Patienten entwickeln auch CED, wobei vorwiegend eine Colitis Ulcerosa (ca. 75 % der Fälle) auftritt^{46,394,395}. Die Prävalenz der Colitis Ulcerosa liegt bei AIH-Patienten bei etwa 16 %. AIH-Patienten mit einer assoziierten CED können zudem eine PSC entwickeln und zeigen sogenannte *Overlap-Syndrome*³⁹⁶⁻³⁹⁸. Daher soll untersucht werden, wie sich eine unzureichende Immunregulation durch IL-10 unter Einfluss einer assoziierten CED auf die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen in der Leber auswirkt. Hierzu sollen IL-10ko unter nicht-Pathogen-freien Verhältnissen gehalten und die Leberentzündung vergleichend nach Autoantigen-spezifischer und Autoantigen-unspezifischer Immunsierung untersucht werden. Zudem stehen in unserer Arbeitsgruppe IL-10ko Mäuse zur Verfügung, die transgen das HLA-DR3 Molekül exprimieren (DR3xIL-10ko). In einer Studie von Mix *et al.* wurden HLA-DR3-restringierte Epitope des SepSecS-Proteins beschrieben, die von autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen erkannt werden²⁵⁵. Mit Hilfe von Tetrameren können autoreaktive T-Zellen in diesem Modell visualisiert werden und erlauben damit gezielte Untersuchungen sowohl zur Aktivierung und Proliferation autoreaktiver T-Zellen als auch weitere phänotypische Charakterisierungen.

5. Zusammenfassung

Die Immunpathogenese autoimmuner Lebererkrankungen ist bisher unzureichend verstanden, und es gibt zurzeit keine spezifische Therapie für diese Erkrankungen. Eine gestörte Balance zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Immunantworten scheint an der Pathogenese autoimmuner Lebererkrankungen beteiligt zu sein. Autoimmune Lebererkrankungen sind mit aggressiven proinflammatorischen T-Zellantworten assoziiert, die gegen Antigene in der Leber gerichtet sind. Die Anzahl bzw. suppressive Funktion regulatorischer T-Zellen, die u.a. durch die Sekretion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 charakterisiert sind, scheint hingegen verringert zu sein. Zusätzlich deuten verschiedene Studien auf eine unzureichende Regulation proinflammatorischer Immunantworten durch IL-10 bei Patienten mit autoimmunen Lebererkrankungen hin. Ziel dieser Arbeit war es daher, immunregulatorische Mechanismen von IL-10 zu identifizieren, die die Progression von autoimmunen Lebererkrankungen hemmen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Bedeutung von IL-10 auf die Kontrolle autoimmuner Lebererkrankungen vergleichend in Wildtyp Mäusen und IL-10-defizienten Mäusen nach Autoantigen-spezifischer und Autoantigen-unspezifischer Immunisierung durchgeführt. Hierbei entwickelten IL-10-defiziente Mäuse im Vergleich zum Wildtyp eine stärkere Hepatitis, die durch portale, periportale und lobuläre Infiltrate gekennzeichnet war. Funktionelle und phänotypische Charakterisierungen intrahepatischer T-Zellen zeigten, dass durch die fehlende IL-10-Signalgebung die Akkumulation pathogener Autoantigen-spezifischer und Autoantigen-unspezifischer T_H1 und T_H17 Zellen in der Leber gefördert wird. Eine erhöhte intrahepatische Frequenz von T_H1 und T_H17 Zellen wird auch bei Patienten mit autoimmunen Lebererkrankungen beobachtet. Autoreaktive T-Zellen werden in den sekundären lymphatischen Organen aktiviert, aus denen autoreaktive T-Effektorzellen ins Blut und weiter in verschiedene Gewebe migrieren. Die Regulation der Aktivierung und Differenzierung autoreaktiver T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen ist deshalb ein wichtiger früher Schritt in der Pathogenese autoimmuner Erkrankungen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Defizienz von IL-10 zu einer verstärkten Differenzierung zu proinflammatorischen Autoantigen-spezifischen und Autoantigen-unspezifischen T_H1 und T_H17 Zellen in den sekundären lymphatischen Organen führt. Expressionsanalysen zeigten weiter, dass IL-10 die hepatische Expression von inflammatorischen Chemokinen inhibiert, die die Rekrutierung proinflammatorischer T-Zellen in die Leber fördern, und auf diese Weise die Migration von T-Zellen in die Leber supprimiert. In Abwesenheit von IL-10 kommt es daher zur Akkumulation von T_H1 und T_H17 Zellen und auch von zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen in der Leber. Weiter wurde gezeigt, dass die Abwesenheit von IL-10 die antigenpräsentierende Funktion von APC in der Leber steigert

(erhöhte Expression von MHCII und CD80). Auf diese Weise kann die Aktivierung infiltrierender T-Zellen in der Leber gefördert werden. Darüber hinaus führt das Fehlen von IL-10 zu einer verstärkten intrahepatischen Expression von IL-1 β , IL-6, TGF β und IL-23, die essentiell für die Generierung, Amplifizierung und Stabilisierung des T_H17 Phänotyps sind. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen setzen intrahepatische T-Zellen IL-10-defizienter Mäuse nach *in vitro* Restimulation erhöhte Mengen proinflammatorischer Zytokine wie IFN γ , IL-17 und GM-CSF frei, deren Sekretion mit verschiedenen organspezifischen autoimmunen Erkrankungen assoziiert wird. IL-10 greift damit nicht nur regulatorisch auf die frühe Differenzierung proinflammatorischer T-Zellen ein, sondern auch auf die Migration von T-Effektorzellen in die Leber sowie die Aktivierung und Aufrechterhaltung von T_H1 und T_H17 Antworten in der Leber.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde analysiert, ob IL-10 lediglich indirekt durch seine beschriebenen inhibitorischen Effekte auf die APC-Funktionen agiert oder auch direkt die inflammatorischen Eigenschaften von CD4⁺ T-Zellen beeinflusst. Hierzu wurde ein Mausmodell (CD4dnIL-10R α) gewählt, in dem die IL-10-Signalgebung selektiv in T-Zellen blockiert ist. Sowohl nach Autoantigen-spezifischer als auch nach Autoantigen-unspezifischer Immunisierung generierten diese Mäuse eine Hepatitis, die durch portale, periportale und lobuläre Infiltrate charakterisiert war. Die Entzündungsaktivität der Hepatitis fiel geringer aus als in IL-10-defizienten Mäusen, jedoch erhöht im Vergleich zum Wildtyp. In diesem Modell konnte gezeigt werden, dass die spezifische Blockade der IL-10-Signalgebung in CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zum Wildtyp zu einer verstärkten Differenzierung proinflammatorischer T_H1 und T_H17 Zellen in den sekundären lymphatischen Organen führt. Darüber hinaus zeigten auch intrahepatische T-Zellen nach *ex vivo* Restimulation ein distinktes T_H1 und T_H17 Zytokinprofil. Diese Beobachtungen zeigen, dass IL-10 auch direkt auf T-Zellen wirkt und ihre Differenzierung zu T_H1 und T_H17 Zellen hemmt. Die Migration von CD4⁺ T-Zellen in die Leber war im Vergleich mit Wildtyp Mäusen auch in CD4dnIL-10R α Mäusen erhöht. Die Migration der CD4⁺ T-Zellen korrelierte dabei nicht mit einer erhöhten intrahepatischen Expression inflammatorischer Chemokinliganden, die in diesem System durch IL-10 und andere Mediatoren wie im Wildtyp supprimiert werden kann. Die Ursache für die verstärkte Migration von T-Zellen in die Leber in dieser Situation ist noch unklar. Möglicherweise führt das Fehlen der IL-10-Signalgebung in T-Zellen zu einer veränderten Expression von Adhäsionsmolekülen, durch die eine feste Adhäsion an das sinusoidale Endothel der Leber ermöglicht wird.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass IL-10 eines der Hauptzytokine ist, das die Progression von autoimmunen Lebererkrankungen begrenzen kann. Dabei inhibiert IL-10 nicht nur die antigenpräsentierende Funktion von APC, sondern wirkt auch direkt auf T-Zellen ein und kontrolliert die Differenzierung, die Effektoraktivitäten

und die Migration proinflammatorischer T_H1 und T_H17 Zellen in die Leber. Die vorgestellten Ergebnisse unterstreichen das Potential von IL-10 als eine therapeutisch relevante Zielstruktur in der Behandlung autoimmuner Lebererkrankungen.

6. Abstract

The immune pathology of autoimmune liver diseases is poorly understood and up to now no specific therapy is available. A disturbed balance between proinflammatory and antiinflammatory immune responses seems to be responsible for the pathology of autoimmune liver diseases. In these diseases inflammation and tissue damage is driven by an aggressive T cell-response to antigens present in the liver. However, the frequency or suppressive capacity of regulatory T cells which are characterized by the secretion of the antiinflammatory cytokine IL-10 amongst others seems to be reduced. In addition, several studies point to an insufficient regulation of proinflammatory immune reactions by IL-10 in patients with autoimmune liver diseases. Hence, the aim of this work was to identify immune-regulatory mechanisms of IL-10 which could restrain the progression of autoimmune liver diseases.

In the first part of this study the role of IL-10 in liver inflammation was addressed in comparative experiments of wild type mice and IL-10-deficient mice and the induction of hepatitis by autoantigen-specific and autoantigen-unspecific immunization. The results of this study demonstrate that IL-10-deficient mice manifested a significant degree of liver inflammation in comparison to wild type mice which was hallmarked by portal, periportal and lobular leukocytic infiltrates in the liver. Functional and phenotypic analyses of intrahepatic T cells revealed the accumulation of autoantigen-specific and autoantigen-unspecific T_H1 and T_H17 cells in the absense of IL-10. The intrahepatic frequency of T_H1 and T_H17 cells is also increased in patients with autoimmune liver diseases.

Autoreactive T cells differentiate into T effector cells in the secondary lymphoid organs from which autoreactive T effector cells migrate into the blood and further to different tissues. Therefore, the regulation of the activation and differentiation of autoreactive T cells in the secondary lymphoid organs is crucial in the pathogenesis of autoimmune diseases. This study shows that the absence of IL-10 leads to increased differentiation to proinflammatory autoantigen-specific and autoantigen-unspecific T_H1 and T_H17 cells in the secondary lymphoid organs. Moreover, pathogenic T_H1 cells and T_H17 cells and also cytotoxic CD8⁺ T cells accumulated in the liver of IL-10 deficient mice. Expression studies further revealed that IL-10 regulates the migration of T cells into the liver by suppression of the intrahepatic expression of inflammatory chemokines that are involved in the recruitment of proinflammatory T cells. Furthermore, the absence of IL-10 leads to enhanced MHCII and CD80 expression and, thus, to enhanced antigen presenting capacity of APC in the liver. In this way, the activation of infiltrating T cells in the liver can be further propagated. Finally, the IL-10 deficiency results in enhanced intrahepatic expression of IL-1 β , IL-6, TGF β and IL-23 which are essential for the generation, amplification and stabilization of the T_H17 phenotype. In concordance with these observations, intrahepatic T cells of IL-10-deficient mice release

enhanced amounts of inflammatory cytokines like IFN γ , IL-17 and GM-CSF upon activation *in vitro*. These Mediators are associated with different organ-specific autoimmune diseases. Together these results demonstrate that IL-10 not only suppresses early differentiation of inflammatory T effector cells but in addition regulates the migration of T effector cells into the liver as well as the activation and maintenance of the inflammatory T_H1 and T_H17 responses in the liver.

In the second part of this study it was analysed whether the inhibitory effects of IL-10 on liver inflammation are mediated indirectly through the described inhibitory effects on APCs, or also directly by inhibiting the inflammatory activity of CD4⁺ T-cells. To address this issue, the CD4dnIL-10R α mouse model was employed in which IL-10 signalling is selectively blocked in T cells, thus allowing analysis of the effects on T cells with preserved functionality of APCs. We demonstrate that these mice developed histological hepatitis with portal, periportal and lobular leukocytic infiltrates induced by autoantigen-specific and autoantigen-unspecific immunization. Inflammatory activity appeared to be reduced in comparison to hepatitis observed in IL-10-deficient mice, however, was still increased in comparison to wild type mice. Furthermore, the blockade of IL-10 signalling in CD4⁺ T cells promoted increased differentiation to proinflammatory T_H1 and T_H17 cells in the secondary lymphoid organs and intrahepatic T cells of CD4dnIL-10R α mice showed an increased T_H1 and T_H17 cytokine profile in comparison to wild type T cells. These results show a direct effect of IL-10 on T cells leading to the inhibition of T_H1 and T_H17 differentiation. CD4⁺ T cells, however, still accumulated in the liver of CD4dnIL-10R α mice. Thereby, the increased migration of CD4⁺ T cells into the liver of CD4dnIL-10R mice did not correlate with increased hepatic expression of inflammatory chemokines which can be suppressed by IL-10 and other mediators in this system as in wild type mice. The mechanisms leading to enhanced migration of T cells into the liver in this situation are not yet clear. A possible explanation could be that missing IL-10 signalling in T cells may lead to altered expression of adhesion molecules that allow firm adhesion of T cells to sinusoidal endothelial cells of the liver.

Taken together, the results of this study suggest that IL-10 represents a major factor restricting autoimmune liver inflammation by acting on APC as well as T cells. In this way, IL-10 controls differentiation, effector activity and migration of proinflammatory T_H1 and T_H17 cells into the liver. These results underline the potential of IL-10 as a therapeutic target structure for the treatment of autoimmune liver diseases.

7. Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

- 1 Bowen, D. G., McCaughan, G. W. & Bertolino, P. Intrahepatic immunity: a tale of two sites? *Trends in immunology* **26**, 512-517, doi:10.1016/j.it.2005.08.005 (2005).
- 2 Crispe, I. N. The liver as a lymphoid organ. *Annual review of immunology* **27**, 147-163, doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132629 (2009).
- 3 Klugewitz, K., Adams, D. H., Emoto, M., Eulenburg, K. & Hamann, A. The composition of intrahepatic lymphocytes: shaped by selective recruitment? *Trends in immunology* **25**, 590-594, doi:10.1016/j.it.2004.09.006 (2004).
- 4 Racanelli, V. & Rehermann, B. The liver as an immunological organ. *Hepatology* **43**, S54-62, doi:10.1002/hep.21060 (2006).
- 5 Tacke, F., Luedde, T. & Trautwein, C. Inflammatory pathways in liver homeostasis and liver injury. *Clinical reviews in allergy & immunology* **36**, 4-12, doi:10.1007/s12016-008-8091-0 (2009).
- 6 Lau, A. H., de Creus, A., Lu, L. & Thomson, A. W. Liver tolerance mediated by antigen presenting cells: fact or fiction? *Gut* **52**, 1075-1078 (2003).
- 7 Sato, K., Yabuki, K., Haba, T. & Maekawa, T. Role of Kupffer cells in the induction of tolerance after liver transplantation. *The Journal of surgical research* **63**, 433-438, doi:10.1006/jsre.1996.0288 (1996).
- 8 Tiegs, G. & Lohse, A. W. Immune tolerance: what is unique about the liver. *Journal of autoimmunity* **34**, 1-6, doi:10.1016/j.jaut.2009.08.008 (2010).
- 9 Selmi, C., Mackay, I. R. & Gershwin, M. E. The immunological milieu of the liver. *Seminars in liver disease* **27**, 129-139, doi:10.1055/s-2007-979466 (2007).
- 10 Unanue, E. R. Antigen-presenting function of the macrophage. *Annual review of immunology* **2**, 395-428, doi:10.1146/annurev.iy.02.040184.002143 (1984).
- 11 Morrison, L. A., Lukacher, A. E., Braciale, V. L., Fan, D. P. & Braciale, T. J. Differences in antigen presentation to MHC class I-and class II-restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clones. *The Journal of experimental medicine* **163**, 903-921 (1986).
- 12 Acuto, O. & Michel, F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nature reviews. Immunology* **3**, 939-951, doi:10.1038/nri1248 (2003).
- 13 Steimle, V., Siegrist, C. A., Mottet, A., Lisowska-Groszpiere, B. & Mach, B. Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* **265**, 106-109 (1994).
- 14 Jenne, C. N. & Kubes, P. Immune surveillance by the liver. *Nature immunology* **14**, 996-1006, doi:10.1038/ni.2691 (2013).

- 15 Thomson, A. W. & Knolle, P. A. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nature reviews. Immunology* **10**, 753-766, doi:10.1038/nri2858 (2010).
- 16 You, Q., Cheng, L., Kedl, R. M. & Ju, C. Mechanism of T cell tolerance induction by murine hepatic Kupffer cells. *Hepatology* **48**, 978-990, doi:10.1002/hep.22395 (2008).
- 17 Knolle, P. *et al.* Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *Journal of hepatology* **22**, 226-229 (1995).
- 18 Knolle, P. A. *et al.* Endotoxin down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells. *Journal of immunology* **162**, 1401-1407 (1999).
- 19 Bertolino, P., McCaughan, G. W. & Bowen, D. G. Role of primary intrahepatic T-cell activation in the 'liver tolerance effect'. *Immunology and cell biology* **80**, 84-92, doi:10.1046/j.0818-9641.2001.01048.x (2002).
- 20 Cabillic, F. *et al.* Hepatic environment elicits monocyte differentiation into a dendritic cell subset directing Th2 response. *Journal of hepatology* **44**, 552-559, doi:10.1016/j.jhep.2005.08.010 (2006).
- 21 Knolle, P. A. *et al.* Induction of cytokine production in naive CD4(+) T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells. *Gastroenterology* **116**, 1428-1440 (1999).
- 22 Goddard, S., Youster, J., Morgan, E. & Adams, D. H. Interleukin-10 secretion differentiates dendritic cells from human liver and skin. *The American journal of pathology* **164**, 511-519, doi:10.1016/S0002-9440(10)63141-0 (2004).
- 23 Bamboat, Z. M. *et al.* Human liver dendritic cells promote T cell hyporesponsiveness. *Journal of immunology* **182**, 1901-1911, doi:10.4049/jimmunol.0803404 (2009).
- 24 Wiegand, C. *et al.* Defective T helper response of hepatocyte-stimulated CD4 T cells impairs antiviral CD8 response and viral clearance. *Gastroenterology* **133**, 2010-2018, doi:10.1053/j.gastro.2007.09.007 (2007).
- 25 Bertolino, P., Trescol-Biemont, M. C. & Rabourdin-Combe, C. Hepatocytes induce functional activation of naive CD8+ T lymphocytes but fail to promote survival. *European journal of immunology* **28**, 221-236, doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199801)28:01<221::AID-IMMU221>3.0.CO;2-F (1998).
- 26 Bertolino, P., Heath, W. R., Hardy, C. L., Morahan, G. & Miller, J. F. Peripheral deletion of autoreactive CD8+ T cells in transgenic mice expressing H-2Kb in the liver. *European journal of immunology* **25**, 1932-1942, doi:10.1002/eji.1830250721 (1995).
- 27 Limmer, A. *et al.* Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nature medicine* **6**, 1348-1354, doi:10.1038/82161 (2000).

- 28 Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**, 428-435, doi:10.1038/nature07201 (2008).
- 29 Bilzer, M., Roggel, F. & Gerbes, A. L. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* **26**, 1175-1186, doi:10.1111/j.1478-3231.2006.01342.x (2006).
- 30 Knolle, P. A. Involvement of the liver in the induction of CD8 T cell tolerance towards oral antigen. *Zeitschrift fur Gastroenterologie* **44**, 51-56, doi:10.1055/s-2005-858988 (2006).
- 31 Warren, A. *et al.* T lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* **44**, 1182-1190, doi:10.1002/hep.21378 (2006).
- 32 Franco, A. *et al.* Expression of class I and class II major histocompatibility complex antigens on human hepatocytes. *Hepatology* **8**, 449-454 (1988).
- 33 Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C. A., Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394-397, doi:10.1038/41131 (1997).
- 34 Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801, doi:10.1016/j.cell.2006.02.015 (2006).
- 35 Poltorak, A. *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085-2088 (1998).
- 36 Steinman, R. M., Hawiger, D. & Nussenzweig, M. C. Tolerogenic dendritic cells. *Annual review of immunology* **21**, 685-711, doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141040 (2003).
- 37 Reis e Sousa, C. Dendritic cells in a mature age. *Nature reviews. Immunology* **6**, 476-483, doi:10.1038/nri1845 (2006).
- 38 Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* **327**, 291-295, doi:10.1126/science.1183021 (2010).
- 39 Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology* **11**, 373-384, doi:10.1038/ni.1863 (2010).
- 40 Kudo, S., Matsuno, K., Ezaki, T. & Ogawa, M. A novel migration pathway for rat dendritic cells from the blood: hepatic sinusoids-lymph translocation. *The Journal of experimental medicine* **185**, 777-784 (1997).
- 41 Geginat, J. *et al.* The CD4-centered universe of human T cell subsets. *Seminars in immunology* **25**, 252-262, doi:10.1016/j.smim.2013.10.012 (2013).
- 42 Schumann, J. & Tiegs, G. Pathophysiological mechanisms of TNF during intoxication with natural or man-made toxins. *Toxicology* **138**, 103-126 (1999).

- 43 Rehermann, B. & Nascimbeni, M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nature reviews. Immunology* **5**, 215-229, doi:10.1038/nri1573 (2005).
- 44 Krawitt, E. L. Autoimmune hepatitis. *The New England journal of medicine* **354**, 54-66, doi:10.1056/NEJMra050408 (2006).
- 45 Kaplan, M. M. & Gershwin, M. E. Primary biliary cirrhosis. *The New England journal of medicine* **353**, 1261-1273, doi:10.1056/NEJMra043898 (2005).
- 46 Hirschfield, G. M., Karlsen, T. H., Lindor, K. D. & Adams, D. H. Primary sclerosing cholangitis. *Lancet* **382**, 1587-1599, doi:10.1016/S0140-6736(13)60096-3 (2013).
- 47 Alter, M. J. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World journal of gastroenterology : WJG* **13**, 2436-2441 (2007).
- 48 Wallace, K., Burt, A. D. & Wright, M. C. Liver fibrosis. *The Biochemical journal* **411**, 1-18, doi:10.1042/BJ20071570 (2008).
- 49 Yang, H. I. *et al.* Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *The New England journal of medicine* **347**, 168-174, doi:10.1056/NEJMoa013215 (2002).
- 50 Herkel, J., Schuchmann, M., Tiegs, G. & Lohse, A. W. Immune-mediated liver injury. *Journal of hepatology* **42**, 920-923, doi:10.1016/j.jhep.2005.02.009 (2005).
- 51 Ando, K. *et al.* Mechanisms of class I restricted immunopathology. A transgenic mouse model of fulminant hepatitis. *The Journal of experimental medicine* **178**, 1541-1554 (1993).
- 52 Lohr, H. F., Gerken, G., Schlicht, H. J., Meryer zum Buschenfelde, K. H. & Fleischer, B. Low frequency of cytotoxic liver-infiltrating T lymphocytes specific for endogenous processed surface and core proteins in chronic hepatitis B. *The Journal of infectious diseases* **168**, 1133-1139 (1993).
- 53 Butcher, E. C., Williams, M., Youngman, K., Rott, L. & Briskin, M. Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Advances in immunology* **72**, 209-253 (1999).
- 54 Heydtmann, M. & Adams, D. H. Understanding selective trafficking of lymphocyte subsets. *Gut* **50**, 150-152 (2002).
- 55 Eksteen, B., Afford, S. C., Wigmore, S. J., Holt, A. P. & Adams, D. H. Immune-mediated liver injury. *Seminars in liver disease* **27**, 351-366, doi:10.1055/s-2007-991512 (2007).
- 56 Oo, Y. H., Shetty, S. & Adams, D. H. The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver. *Digestive diseases* **28**, 31-44, doi:10.1159/000282062 (2010).
- 57 Fraser, R., Dobbs, B. R. & Rogers, G. W. Lipoproteins and the liver sieve: the role of the fenestrated sinusoidal endothelium in lipoprotein metabolism, atherosclerosis, and cirrhosis. *Hepatology* **21**, 863-874 (1995).

- 58 Wong, J. *et al.* A minimal role for selectins in the recruitment of leukocytes into the inflamed liver microvasculature. *The Journal of clinical investigation* **99**, 2782-2790, doi:10.1172/JCI119468 (1997).
- 59 Adams, D. H., Hubscher, S. G., Fisher, N. C., Williams, A. & Robinson, M. Expression of E-selectin and E-selectin ligands in human liver inflammation. *Hepatology* **24**, 533-538, doi:10.1002/hep.510240311 (1996).
- 60 Lawrence, M. B. & Springer, T. A. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* **65**, 859-873 (1991).
- 61 Ley, K. *et al.* Lectin-like cell adhesion molecule 1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules in vivo. *Blood* **77**, 2553-2555 (1991).
- 62 Mayadas, T. N., Johnson, R. C., Rayburn, H., Hynes, R. O. & Wagner, D. D. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell* **74**, 541-554 (1993).
- 63 Shamri, R. *et al.* Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. *Nature immunology* **6**, 497-506, doi:10.1038/ni1194 (2005).
- 64 Tanaka, Y. *et al.* T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature* **361**, 79-82, doi:10.1038/361079a0 (1993).
- 65 Steinhoff, G., Behrend, M., Schrader, B., Duijvestijn, A. M. & Wonigeit, K. Expression patterns of leukocyte adhesion ligand molecules on human liver endothelia. Lack of ELAM-1 and CD62 inducibility on sinusoidal endothelia and distinct distribution of VCAM-1, ICAM-1, ICAM-2, and LFA-3. *The American journal of pathology* **142**, 481-488 (1993).
- 66 McNab, G. *et al.* Vascular adhesion protein 1 mediates binding of T cells to human hepatic endothelium. *Gastroenterology* **110**, 522-528 (1996).
- 67 Karlmark, K. R., Wasmuth, H. E., Trautwein, C. & Tacke, F. Chemokine-directed immune cell infiltration in acute and chronic liver disease. *Expert review of gastroenterology & hepatology* **2**, 233-242, doi:10.1586/17474124.2.2.233 (2008).
- 68 Kim, C. H. Chemokine-chemokine receptor network in immune cell trafficking. *Current drug targets. Immune, endocrine and metabolic disorders* **4**, 343-361 (2004).
- 69 Moser, B., Wolf, M., Walz, A. & Loetscher, P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends in immunology* **25**, 75-84, doi:10.1016/j.it.2003.12.005 (2004).
- 70 Gerard, C. & Rollins, B. J. Chemokines and disease. *Nature immunology* **2**, 108-115, doi:10.1038/84209 (2001).

- 71 Moser, B. & Willmann, K. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Annals of the rheumatic diseases* **63 Suppl 2**, ii84-ii89, doi:10.1136/ard.2004.028316 (2004).
- 72 Shetty, S., Lalor, P. F. & Adams, D. H. Lymphocyte recruitment to the liver: molecular insights into the pathogenesis of liver injury and hepatitis. *Toxicology* **254**, 136-146, doi:10.1016/j.tox.2008.08.003 (2008).
- 73 Lalor, P. F., Shields, P., Grant, A. & Adams, D. H. Recruitment of lymphocytes to the human liver. *Immunology and cell biology* **80**, 52-64, doi:10.1046/j.1440-1711.2002.01062.x (2002).
- 74 Curbishley, S. M., Eksteen, B., Gladue, R. P., Lalor, P. & Adams, D. H. CXCR 3 activation promotes lymphocyte transendothelial migration across human hepatic endothelium under fluid flow. *The American journal of pathology* **167**, 887-899, doi:10.1016/S0002-9440(10)62060-3 (2005).
- 75 Arai, K., Liu, Z. X., Lane, T. & Dennert, G. IP-10 and Mig facilitate accumulation of T cells in the virus-infected liver. *Cellular immunology* **219**, 48-56 (2002).
- 76 Dumoulin, F. L. *et al.* Semiquantitative analysis of intrahepatic cytokine mRNAs in chronic hepatitis C. *The Journal of infectious diseases* **175**, 681-685 (1997).
- 77 Diago, M. *et al.* Association of pretreatment serum interferon gamma inducible protein 10 levels with sustained virological response to peginterferon plus ribavirin therapy in genotype 1 infected patients with chronic hepatitis C. *Gut* **55**, 374-379, doi:10.1136/gut.2005.074062 (2006).
- 78 Apolinario, A. *et al.* Increased expression of T cell chemokines and their receptors in chronic hepatitis C: relationship with the histological activity of liver disease. *The American journal of gastroenterology* **97**, 2861-2870, doi:10.1111/j.1572-0241.2002.07054.x (2002).
- 79 Larrubia, J. R. *et al.* The role of CCR5/CXCR3 expressing CD8+ cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis C virus infection. *Journal of hepatology* **47**, 632-641, doi:10.1016/j.jhep.2007.04.009 (2007).
- 80 Butera, D. *et al.* Plasma chemokine levels correlate with the outcome of antiviral therapy in patients with hepatitis C. *Blood* **106**, 1175-1182, doi:10.1182/blood-2005-01-0126 (2005).
- 81 Nishioji, K. *et al.* Increase of chemokine interferon-inducible protein-10 (IP-10) in the serum of patients with autoimmune liver diseases and increase of its mRNA expression in hepatocytes. *Clinical and experimental immunology* **123**, 271-279 (2001).

- 82 Harvey, C. E. *et al.* Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation. *Journal of leukocyte biology* **74**, 360-369 (2003).
- 83 Narumi, S. *et al.* Expression of IFN-inducible protein-10 in chronic hepatitis. *Journal of immunology* **158**, 5536-5544 (1997).
- 84 Shields, P. L. *et al.* Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *Journal of immunology* **163**, 6236-6243 (1999).
- 85 Oo, Y. H. & Adams, D. H. The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver. *Journal of autoimmunity* **34**, 45-54, doi:10.1016/j.jaut.2009.07.011 (2010).
- 86 Boisvert, J. *et al.* Liver-infiltrating lymphocytes in end-stage hepatitis C virus: subsets, activation status, and chemokine receptor phenotypes. *Journal of hepatology* **38**, 67-75 (2003).
- 87 Lichterfeld, M. *et al.* Reduced CC chemokine receptor (CCR) 1 and CCR5 surface expression on peripheral blood T lymphocytes from patients with chronic hepatitis C infection. *The Journal of infectious diseases* **185**, 1803-1807, doi:10.1086/340829 (2002).
- 88 Viola, A. & Luster, A. D. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annual review of pharmacology and toxicology* **48**, 171-197, doi:10.1146/annurev.pharmtox.48.121806.154841 (2008).
- 89 Goddard, S. *et al.* Differential expression of chemokines and chemokine receptors shapes the inflammatory response in rejecting human liver transplants. *Transplantation* **72**, 1957-1967 (2001).
- 90 Murai, M. *et al.* Active participation of CCR5(+)CD8(+) T lymphocytes in the pathogenesis of liver injury in graft-versus-host disease. *The Journal of clinical investigation* **104**, 49-57, doi:10.1172/JCI6642 (1999).
- 91 Oo, Y. H. *et al.* CXCR3-dependent recruitment and CCR6-mediated positioning of Th-17 cells in the inflamed liver. *Journal of hepatology* **57**, 1044-1051, doi:10.1016/j.jhep.2012.07.008 (2012).
- 92 Croft, M., Duncan, D. D. & Swain, S. L. Response of naive antigen-specific CD4+ T cells in vitro: characteristics and antigen-presenting cell requirements. *The Journal of experimental medicine* **176**, 1431-1437 (1992).
- 93 Mosmann, T. R. & Coffman, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual review of immunology* **7**, 145-173, doi:10.1146/annurev.iy.07.040189.001045 (1989).

- 94 Trinchieri, G., Pflanz, S. & Kastelein, R. A. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* **19**, 641-644 (2003).
- 95 Lugo-Villarino, G., Maldonado-Lopez, R., Possemato, R., Penaranda, C. & Glimcher, L. H. T-bet is required for optimal production of IFN-gamma and antigen-specific T cell activation by dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 7749-7754, doi:10.1073/pnas.1332767100 (2003).
- 96 Murphy, K. M. & Reiner, S. L. The lineage decisions of helper T cells. *Nature reviews. Immunology* **2**, 933-944, doi:10.1038/nri954 (2002).
- 97 Afkarian, M. *et al.* T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nature immunology* **3**, 549-557, doi:10.1038/ni794 (2002).
- 98 Skapenko, A., Leipe, J., Lipsky, P. E. & Schulze-Koops, H. The role of the T cell in autoimmune inflammation. *Arthritis research & therapy* **7 Suppl 2**, S4-14, doi:10.1186/ar1703 (2005).
- 99 Billiau, A. Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis. *Advances in immunology* **62**, 61-130 (1996).
- 100 Figueiredo, F., Koerner, T. J. & Adams, D. O. Molecular mechanisms regulating the expression of class II histocompatibility molecules on macrophages. Effects of inductive and suppressive signals on gene transcription. *Journal of immunology* **143**, 3781-3786 (1989).
- 101 Lafuse, W. P., Brown, D., Castle, L. & Zwillig, B. S. IFN-gamma increases cathepsin H mRNA levels in mouse macrophages. *Journal of leukocyte biology* **57**, 663-669 (1995).
- 102 Lah, T. T., Hawley, M., Rock, K. L. & Goldberg, A. L. Gamma-interferon causes a selective induction of the lysosomal proteases, cathepsins B and L, in macrophages. *FEBS letters* **363**, 85-89 (1995).
- 103 Mach, B., Steimle, V., Martinez-Soria, E. & Reith, W. Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annual review of immunology* **14**, 301-331, doi:10.1146/annurev.immunol.14.1.301 (1996).
- 104 Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. & Howard, J. C. Cellular responses to interferon-gamma. *Annual review of immunology* **15**, 749-795, doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.749 (1997).
- 105 Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T. & Hume, D. A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology* **75**, 163-189, doi:10.1189/jlb.0603252 (2004).
- 106 Muranski, P. & Restifo, N. P. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood* **121**, 2402-2414, doi:10.1182/blood-2012-09-378653 (2013).

- 107 Kim, H. P., Imbert, J. & Leonard, W. J. Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine & growth factor reviews* **17**, 349-366, doi:10.1016/j.cytogfr.2006.07.003 (2006).
- 108 Gattinoni, L. *et al.* Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells. *The Journal of clinical investigation* **115**, 1616-1626, doi:10.1172/JCI24480 (2005).
- 109 Williams, M. A., Tyznik, A. J. & Bevan, M. J. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature* **441**, 890-893, doi:10.1038/nature04790 (2006).
- 110 Abbas, A. K., Murphy, K. M. & Sher, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**, 787-793, doi:10.1038/383787a0 (1996).
- 111 Chavez-Galan, L., Arenas-Del Angel, M. C., Zenteno, E., Chavez, R. & Lascurain, R. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cellular & molecular immunology* **6**, 15-25, doi:10.1038/cmi.2009.3 (2009).
- 112 Koppers, R. C. & Henney, C. S. Studies on the mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. IX. Relationships between antigen recognition and lytic expression in killer T cells. *Journal of immunology* **118**, 71-76 (1977).
- 113 Ngai, P. *et al.* Gamma interferon responses of CD4 and CD8 T-cell subsets are quantitatively different and independent of each other during pulmonary Mycobacterium bovis BCG infection. *Infection and immunity* **75**, 2244-2252, doi:10.1128/IAI.00024-07 (2007).
- 114 Robinson, R. T. *et al.* End-organ damage in a mouse model of fulminant liver inflammation requires CD4+ T cell production of IFN-gamma but is independent of Fas. *Journal of immunology* **182**, 3278-3284, doi:10.4049/jimmunol.0803417 (2009).
- 115 Nishimura, T. & Ohta, A. A critical role for antigen-specific Th1 cells in acute liver injury in mice. *Journal of immunology* **162**, 6503-6509 (1999).
- 116 Tanaka, Y. *et al.* Establishment of a T cell-dependent nude mouse liver injury model induced by Propionibacterium acnes and LPS. *Journal of immunological methods* **182**, 21-28 (1995).
- 117 Tanaka, Y. *et al.* A pivotal role of IL-12 in Th1-dependent mouse liver injury. *International immunology* **8**, 569-576 (1996).
- 118 Jager, A. & Kuchroo, V. K. Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. *Scandinavian journal of immunology* **72**, 173-184, doi:10.1111/j.1365-3083.2010.02432.x (2010).
- 119 Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D. & Xia, B. CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clinical & developmental immunology* **2012**, 925135, doi:10.1155/2012/925135 (2012).

- 120 Damsker, J. M., Hansen, A. M. & Caspi, R. R. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1183**, 211-221, doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05133.x (2010).
- 121 Lohr, H. F. *et al.* Phenotypical analysis and cytokine release of liver-infiltrating and peripheral blood T lymphocytes from patients with chronic hepatitis of different etiology. *Liver* **14**, 161-166 (1994).
- 122 Harada, K. *et al.* In situ nucleic acid hybridization of pyruvate dehydrogenase complex-E2 in primary biliary cirrhosis: pyruvate dehydrogenase complex-E2 messenger RNA is expressed in hepatocytes but not in biliary epithelium. *Hepatology* **25**, 27-32, doi:10.1002/hep.510250106 (1997).
- 123 Bo, X., Broome, U., Remberger, M. & Sumitran-Holgersson, S. Tumour necrosis factor alpha impairs function of liver derived T lymphocytes and natural killer cells in patients with primary sclerosing cholangitis. *Gut* **49**, 131-141 (2001).
- 124 Lohr, H. F. *et al.* Autoreactive CD4+ LKM-specific and anticlonotypic T-cell responses in LKM-1 antibody-positive autoimmune hepatitis. *Hepatology* **24**, 1416-1421, doi:10.1002/hep.510240619 (1996).
- 125 Caspi, R. R. *et al.* Genetic susceptibility to experimental autoimmune uveoretinitis in the rat is associated with an elevated Th1 response. *Journal of immunology* **157**, 2668-2675 (1996).
- 126 Tarrant, T. K., Silver, P. B., Chan, C. C., Wiggert, B. & Caspi, R. R. Endogenous IL-12 is required for induction and expression of experimental autoimmune uveitis. *Journal of immunology* **161**, 122-127 (1998).
- 127 Germann, T., Hess, H., Szeliga, J. & Rude, E. Characterization of the adjuvant effect of IL-12 and efficacy of IL-12 inhibitors in type II collagen-induced arthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **795**, 227-240 (1996).
- 128 Saoudi, A. *et al.* TH2 activated cells prevent experimental autoimmune uveoretinitis, a TH1-dependent autoimmune disease. *European journal of immunology* **23**, 3096-3103, doi:10.1002/eji.1830231208 (1993).
- 129 Cua, D. J., Hinton, D. R. & Stohlman, S. A. Self-antigen-induced Th2 responses in experimental allergic encephalomyelitis (EAE)-resistant mice. Th2-mediated suppression of autoimmune disease. *Journal of immunology* **155**, 4052-4059 (1995).
- 130 Merrill, J. E. *et al.* Inflammatory leukocytes and cytokines in the peptide-induced disease of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and B10.PL mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 574-578 (1992).
- 131 Renno, T., Krakowski, M., Piccirillo, C., Lin, J. Y. & Owens, T. TNF-alpha expression by resident microglia and infiltrating leukocytes in the central nervous system of mice

- with experimental allergic encephalomyelitis. Regulation by Th1 cytokines. *Journal of immunology* **154**, 944-953 (1995).
- 132 Pettinelli, C. B. & McFarlin, D. E. Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes. *Journal of immunology* **127**, 1420-1423 (1981).
- 133 Szabo, S. J. *et al.* Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN- γ production in CD4 and CD8 T cells. *Science* **295**, 338-342, doi:10.1126/science.1065543 (2002).
- 134 Aujla, S. J. *et al.* IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nature medicine* **14**, 275-281, doi:10.1038/nm1710 (2008).
- 135 Chen, K. *et al.* Th17 cells mediate clade-specific, serotype-independent mucosal immunity. *Immunity* **35**, 997-1009, doi:10.1016/j.immuni.2011.10.018 (2011).
- 136 Khader, S. A., Gaffen, S. L. & Kolls, J. K. Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosal immunology* **2**, 403-411, doi:10.1038/mi.2009.100 (2009).
- 137 Ouyang, W., Kolls, J. K. & Zheng, Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* **28**, 454-467, doi:10.1016/j.immuni.2008.03.004 (2008).
- 138 Hofstetter, H. H. *et al.* Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cellular immunology* **237**, 123-130, doi:10.1016/j.cellimm.2005.11.002 (2005).
- 139 Komiyama, Y. *et al.* IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* **177**, 566-573 (2006).
- 140 Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology* **27**, 485-517, doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132710 (2009).
- 141 Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K. & Iwakura, Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *Journal of immunology* **171**, 6173-6177 (2003).
- 142 Vaknin-Dembinsky, A., Balashov, K. & Weiner, H. L. IL-23 is increased in dendritic cells in multiple sclerosis and down-regulation of IL-23 by antisense oligos increases dendritic cell IL-10 production. *Journal of immunology* **176**, 7768-7774 (2006).
- 143 Lafdil, F., Miller, A. M., Ki, S. H. & Gao, B. Th17 cells and their associated cytokines in liver diseases. *Cellular & molecular immunology* **7**, 250-254, doi:10.1038/cmi.2010.5 (2010).
- 144 Harada, K. *et al.* Periductal interleukin-17 production in association with biliary innate immunity contributes to the pathogenesis of cholangiopathy in primary biliary

- cirrhosis. *Clinical and experimental immunology* **157**, 261-270, doi:10.1111/j.1365-2249.2009.03947.x (2009).
- 145 Lan, R. Y. *et al.* Hepatic IL-17 responses in human and murine primary biliary cirrhosis. *Journal of autoimmunity* **32**, 43-51, doi:10.1016/j.jaut.2008.11.001 (2009).
- 146 Zhao, L. *et al.* Interleukin-17 contributes to the pathogenesis of autoimmune hepatitis through inducing hepatic interleukin-6 expression. *PloS one* **6**, e18909, doi:10.1371/journal.pone.0018909 (2011).
- 147 Ge, J. *et al.* Implication of Th17 and Th1 cells in patients with chronic active hepatitis B. *Journal of clinical immunology* **30**, 60-67, doi:10.1007/s10875-009-9328-2 (2010).
- 148 Lemmers, A. *et al.* The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease. *Hepatology* **49**, 646-657, doi:10.1002/hep.22680 (2009).
- 149 Zhang, J. Y. *et al.* Interleukin-17-producing CD4(+) T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* **51**, 81-91, doi:10.1002/hep.23273 (2010).
- 150 Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M. & Stockinger, B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* **24**, 179-189, doi:10.1016/j.immuni.2006.01.001 (2006).
- 151 Veldhoen, M. & Stockinger, B. TGFbeta1, a "Jack of all trades": the link with pro-inflammatory IL-17-producing T cells. *Trends in immunology* **27**, 358-361, doi:10.1016/j.it.2006.06.001 (2006).
- 152 Wilson, N. J. *et al.* Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nature immunology* **8**, 950-957, doi:10.1038/ni1497 (2007).
- 153 Chung, Y. *et al.* Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity* **30**, 576-587, doi:10.1016/j.immuni.2009.02.007 (2009).
- 154 Annunziato, F., Cosmi, L., Liotta, F., Maggi, E. & Romagnani, S. Human Th17 cells: are they different from murine Th17 cells? *European journal of immunology* **39**, 637-640, doi:10.1002/eji.200839050 (2009).
- 155 Fossiez, F. *et al.* T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *The Journal of experimental medicine* **183**, 2593-2603 (1996).
- 156 Gaffen, S. L. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nature reviews. Immunology* **9**, 556-567, doi:10.1038/nri2586 (2009).
- 157 Kolls, J. K. & Linden, A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* **21**, 467-476, doi:10.1016/j.immuni.2004.08.018 (2004).

- 158 Laan, M. *et al.* Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *Journal of immunology* **162**, 2347-2352 (1999).
- 159 Schwarzenberger, P. *et al.* IL-17 stimulates granulopoiesis in mice: use of an alternate, novel gene therapy-derived method for in vivo evaluation of cytokines. *Journal of immunology* **161**, 6383-6389 (1998).
- 160 Sergejeva, S., Ivanov, S., Lotvall, J. & Linden, A. Interleukin-17 as a recruitment and survival factor for airway macrophages in allergic airway inflammation. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **33**, 248-253, doi:10.1165/rcmb.2004-0213OC (2005).
- 161 Weaver, C. T., Hatton, R. D., Mangan, P. R. & Harrington, L. E. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annual review of immunology* **25**, 821-852, doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141557 (2007).
- 162 Ge, D. & You, Z. Expression of interleukin-17RC protein in normal human tissues. *International archives of medicine* **1**, 19, doi:10.1186/1755-7682-1-19 (2008).
- 163 El-Behi, M. *et al.* The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nature immunology* **12**, 568-575, doi:10.1038/ni.2031 (2011).
- 164 Codarri, L. *et al.* ROR γ mat drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nature immunology* **12**, 560-567, doi:10.1038/ni.2027 (2011).
- 165 McGeachy, M. J. GM-CSF: the secret weapon in the T(H)17 arsenal. *Nature immunology* **12**, 521-522, doi:10.1038/ni.2044 (2011).
- 166 Basu, R., Hatton, R. D. & Weaver, C. T. The Th17 family: flexibility follows function. *Immunological reviews* **252**, 89-103, doi:10.1111/imr.12035 (2013).
- 167 Cosmi, L. *et al.* Evidence of the transient nature of the Th17 phenotype of CD4⁺CD161⁺ T cells in the synovial fluid of patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis and rheumatism* **63**, 2504-2515, doi:10.1002/art.30332 (2011).
- 168 Kleinschek, M. A. *et al.* Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. *The Journal of experimental medicine* **206**, 525-534, doi:10.1084/jem.20081712 (2009).
- 169 Maggi, L. *et al.* CD4⁺CD161⁺ T lymphocytes infiltrate Crohn's disease-associated perianal fistulas and are reduced by anti-TNF- α local therapy. *International archives of allergy and immunology* **161**, 81-86, doi:10.1159/000343467 (2013).
- 170 Maggi, L. *et al.* Distinctive features of classic and nonclassic (Th17 derived) human Th1 cells. *European journal of immunology* **42**, 3180-3188, doi:10.1002/eji.201242648 (2012).

- 171 Sundrud, M. S. & Trivigno, C. Identity crisis of Th17 cells: many forms, many functions, many questions. *Seminars in immunology* **25**, 263-272, doi:10.1016/j.smim.2013.10.021 (2013).
- 172 Annunziato, F. *et al.* Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *The Journal of experimental medicine* **204**, 1849-1861, doi:10.1084/jem.20070663 (2007).
- 173 Hirota, K. *et al.* Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nature immunology* **12**, 255-263, doi:10.1038/ni.1993 (2011).
- 174 Bending, D. *et al.* Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. *The Journal of clinical investigation* **119**, 565-572, doi:10.1172/JCI37865 (2009).
- 175 Suryani, S. & Sutton, I. An interferon-gamma-producing Th1 subset is the major source of IL-17 in experimental autoimmune encephalitis. *Journal of neuroimmunology* **183**, 96-103, doi:10.1016/j.jneuroim.2006.11.023 (2007).
- 176 Ahern, P. P. *et al.* Interleukin-23 drives intestinal inflammation through direct activity on T cells. *Immunity* **33**, 279-288, doi:10.1016/j.immuni.2010.08.010 (2010).
- 177 Van Parijs, L. & Abbas, A. K. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* **280**, 243-248 (1998).
- 178 Mackay, I. R. Science, medicine, and the future: Tolerance and autoimmunity. *Bmj* **321**, 93-96 (2000).
- 179 Green, D. R., Droin, N. & Pinkoski, M. Activation-induced cell death in T cells. *Immunological reviews* **193**, 70-81 (2003).
- 180 Xing, Y. & Hogquist, K. A. T-cell tolerance: central and peripheral. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**, doi:10.1101/cshperspect.a006957 (2012).
- 181 Frebel, H. & Oxenius, A. The risks of targeting co-inhibitory pathways to modulate pathogen-directed T cell responses. *Trends in immunology* **34**, 193-199, doi:10.1016/j.it.2012.12.002 (2013).
- 182 van Parijs, L., Perez, V. L. & Abbas, A. K. Mechanisms of peripheral T cell tolerance. *Novartis Foundation symposium* **215**, 5-14; discussion 14-20, 33-40 (1998).
- 183 Ng, T. H. *et al.* Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Frontiers in immunology* **4**, 129, doi:10.3389/fimmu.2013.00129 (2013).
- 184 Fiorentino, D. F., Bond, M. W. & Mosmann, T. R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *The Journal of experimental medicine* **170**, 2081-2095 (1989).
- 185 O'Garra, A. & Vieira, P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nature medicine* **10**, 801-805, doi:10.1038/nm0804-801 (2004).

- 186 Roncarolo, M. G. *et al.* Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunological reviews* **212**, 28-50, doi:10.1111/j.0105-2896.2006.00420.x (2006).
- 187 Sabatos-Peyton, C. A., Verhagen, J. & Wraith, D. C. Antigen-specific immunotherapy of autoimmune and allergic diseases. *Current opinion in immunology* **22**, 609-615, doi:10.1016/j.coi.2010.08.006 (2010).
- 188 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. *Journal of immunology* **155**, 1151-1164 (1995).
- 189 Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T. & Ono, M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* **133**, 775-787, doi:10.1016/j.cell.2008.05.009 (2008).
- 190 Mills, K. H. & McGuirk, P. Antigen-specific regulatory T cells--their induction and role in infection. *Seminars in immunology* **16**, 107-117, doi:10.1016/j.smim.2003.12.006 (2004).
- 191 Wu, K., Bi, Y., Sun, K. & Wang, C. IL-10-producing type 1 regulatory T cells and allergy. *Cellular & molecular immunology* **4**, 269-275 (2007).
- 192 Beissert, S., Schwarz, A. & Schwarz, T. Regulatory T cells. *The Journal of investigative dermatology* **126**, 15-24, doi:10.1038/sj.jid.5700004 (2006).
- 193 Sakaguchi, S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual review of immunology* **22**, 531-562, doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141122 (2004).
- 194 Tadokoro, C. E. *et al.* Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4⁺ T cells and dendritic cells in vivo. *The Journal of experimental medicine* **203**, 505-511, doi:10.1084/jem.20050783 (2006).
- 195 Shevach, E. M. Mechanisms of foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* **30**, 636-645, doi:10.1016/j.immuni.2009.04.010 (2009).
- 196 Jutel, M. & Akdis, C. A. T-cell regulatory mechanisms in specific immunotherapy. *Chemical immunology and allergy* **94**, 158-177, doi:10.1159/000155000 (2008).
- 197 Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. & O'Garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology* **19**, 683-765, doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.683 (2001).
- 198 Platzer, C., Docke, W., Volk, H. & Prosch, S. Catecholamines trigger IL-10 release in acute systemic stress reaction by direct stimulation of its promoter/enhancer activity in monocytic cells. *Journal of neuroimmunology* **105**, 31-38 (2000).

- 199 Riese, U. *et al.* Catecholamines induce IL-10 release in patients suffering from acute myocardial infarction by transactivating its promoter in monocytic but not in T-cells. *Molecular and cellular biochemistry* **212**, 45-50 (2000).
- 200 Barsig, J. *et al.* Lipopolysaccharide-induced interleukin-10 in mice: role of endogenous tumor necrosis factor-alpha. *European journal of immunology* **25**, 2888-2893, doi:10.1002/eji.1830251027 (1995).
- 201 Asadullah, K., Sterry, W. & Volk, H. D. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacological reviews* **55**, 241-269, doi:10.1124/pr.55.2.4 (2003).
- 202 Wan, S. *et al.* Hepatic release of interleukin-10 during cardiopulmonary bypass in steroid-pretreated patients. *American heart journal* **133**, 335-339 (1997).
- 203 Dumoutier, L. & Renauld, J. C. Viral and cellular interleukin-10 (IL-10)-related cytokines: from structures to functions. *European cytokine network* **13**, 5-15 (2002).
- 204 Liu, Y., Wei, S. H., Ho, A. S., de Waal Malefyt, R. & Moore, K. W. Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. *Journal of immunology* **152**, 1821-1829 (1994).
- 205 Tan, J. C., Indelicato, S. R., Narula, S. K., Zavodny, P. J. & Chou, C. C. Characterization of interleukin-10 receptors on human and mouse cells. *The Journal of biological chemistry* **268**, 21053-21059 (1993).
- 206 Liu, Y. *et al.* The EBV IL-10 homologue is a selective agonist with impaired binding to the IL-10 receptor. *Journal of immunology* **158**, 604-613 (1997).
- 207 Ho, A. S. *et al.* A receptor for interleukin 10 is related to interferon receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 11267-11271 (1993).
- 208 Kotenko, S. V. *et al.* Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. *The EMBO journal* **16**, 5894-5903, doi:10.1093/emboj/16.19.5894 (1997).
- 209 Spencer, S. D. *et al.* The orphan receptor CRF2-4 is an essential subunit of the interleukin 10 receptor. *The Journal of experimental medicine* **187**, 571-578 (1998).
- 210 Carson, W. E. *et al.* The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killer cells. *Blood* **85**, 3577-3585 (1995).
- 211 Jurlander, J. *et al.* Characterization of interleukin-10 receptor expression on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* **89**, 4146-4152 (1997).
- 212 Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N. K., Valdez, P. A. & Hymowitz, S. G. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annual review of immunology* **29**, 71-109, doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101312 (2011).

- 213 Lutfalla, G., Gardiner, K. & Uze, G. A new member of the cytokine receptor gene family maps on chromosome 21 at less than 35 kb from IFNAR. *Genomics* **16**, 366-373, doi:10.1006/geno.1993.1199 (1993).
- 214 Gibbs, V. C. & Pennica, D. CRF2-4: isolation of cDNA clones encoding the human and mouse proteins. *Gene* **186**, 97-101 (1997).
- 215 Santucci, L. *et al.* Interleukin 10 reduces lethality and hepatic injury induced by lipopolysaccharide in galactosamine-sensitized mice. *Gastroenterology* **111**, 736-744 (1996).
- 216 Louis, H. *et al.* Hepatoprotective role of interleukin 10 in galactosamine/lipopolysaccharide mouse liver injury. *Gastroenterology* **112**, 935-942 (1997).
- 217 Louis, H. *et al.* Production and role of interleukin-10 in concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* **25**, 1382-1389, doi:10.1002/hep.510250614 (1997).
- 218 Di Marco, R. *et al.* Concanavalin A-induced hepatitis in mice is prevented by interleukin (IL)-10 and exacerbated by endogenous IL-10 deficiency. *Autoimmunity* **31**, 75-83 (1999).
- 219 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* **45**, 475-485, doi:10.1002/hep.21498 (2007).
- 220 Bliss, S. K., Bliss, S. P., Beiting, D. P., Alcaraz, A. & Appleton, J. A. IL-10 regulates movement of intestinally derived CD4+ T cells to the liver. *Journal of immunology* **178**, 7974-7983 (2007).
- 221 Morel, A. S., Quaratino, S., Douek, D. C. & Londei, M. Split activity of interleukin-10 on antigen capture and antigen presentation by human dendritic cells: definition of a maturative step. *European journal of immunology* **27**, 26-34, doi:10.1002/eji.1830270105 (1997).
- 222 Carambia, A. *et al.* Inhibition of inflammatory CD4 T cell activity by murine liver sinusoidal endothelial cells. *Journal of hepatology* **58**, 112-118, doi:10.1016/j.jhep.2012.09.008 (2013).
- 223 Knolle, P. A. *et al.* IL-10 down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells through decreased antigen uptake via the mannose receptor and lowered surface expression of accessory molecules. *Clinical and experimental immunology* **114**, 427-433 (1998).
- 224 de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G. & de Vries, J. E. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *The Journal of experimental medicine* **174**, 1209-1220 (1991).

- 225 Ding, L. & Shevach, E. M. IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. *Journal of immunology* **148**, 3133-3139 (1992).
- 226 Ding, L., Linsley, P. S., Huang, L. Y., Germain, R. N. & Shevach, E. M. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *Journal of immunology* **151**, 1224-1234 (1993).
- 227 Huber, S. *et al.* Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3(-) and Foxp3+ regulatory CD4+ T cells in an interleukin-10-dependent manner. *Immunity* **34**, 554-565, doi:10.1016/j.immuni.2011.01.020 (2011).
- 228 Andre, I. *et al.* Checkpoints in the progression of autoimmune disease: lessons from diabetes models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 2260-2263 (1996).
- 229 Goodnow, C. C. Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 2264-2271 (1996).
- 230 Rocken, M., Urban, J. F. & Shevach, E. M. Infection breaks T-cell tolerance. *Nature* **359**, 79-82, doi:10.1038/359079a0 (1992).
- 231 Wucherpfennig, K. W. & Strominger, J. L. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* **80**, 695-705 (1995).
- 232 Decock, S., McGee, P. & Hirschfield, G. M. Autoimmune liver disease for the non-specialist. *Bmj* **339**, b3305, doi:10.1136/bmj.b3305 (2009).
- 233 Sebode, M. *et al.* Reduced FOXP3(+) regulatory T cells in patients with primary sclerosing cholangitis are associated with IL2RA gene polymorphisms. *Journal of hepatology* **60**, 1010-1016, doi:10.1016/j.jhep.2013.12.027 (2014).
- 234 Lan, R. Y. *et al.* Liver-targeted and peripheral blood alterations of regulatory T cells in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **43**, 729-737, doi:10.1002/hep.21123 (2006).
- 235 Turner, D. M. *et al.* An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *European journal of immunogenetics : official journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics* **24**, 1-8 (1997).
- 236 Parziale, A. *et al.* Inheritance of low IL-10 and TNF-alpha producing genotypes is associated with a higher risk of liver failure in primary biliary cirrhosis (PBC). *Journal of hepatology* **36**, 153, doi:10.1016/S0168-8278(02)80552-9.
- 237 Ma, L., Qin, J., Ji, H., Zhao, P. & Jiang, Y. Tfh and plasma cells are correlated with hypergammaglobulinaemia in patients with autoimmune hepatitis. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, doi:10.1111/liv.12245 (2013).

- 238 Longhi, M. S. *et al.* Impairment of CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells in autoimmune liver disease. *Journal of hepatology* **41**, 31-37, doi:10.1016/j.jhep.2004.03.008 (2004).
- 239 Longhi, M. S. *et al.* Effect of CD4+ CD25+ regulatory T-cells on CD8 T-cell function in patients with autoimmune hepatitis. *Journal of autoimmunity* **25**, 63-71, doi:10.1016/j.jaut.2005.05.001 (2005).
- 240 Longhi, M. S., Ma, Y., Mieli-Vergani, G. & Vergani, D. Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis. *Journal of autoimmunity* **34**, 7-14, doi:10.1016/j.jaut.2009.08.010 (2010).
- 241 Peiseler, M. *et al.* FOXP3+ regulatory T cells in autoimmune hepatitis are fully functional and not reduced in frequency. *Journal of hepatology* **57**, 125-132, doi:10.1016/j.jhep.2012.02.029 (2012).
- 242 Liberal, R., Grant, C. R., Mieli-Vergani, G. & Vergani, D. Autoimmune hepatitis: a comprehensive review. *Journal of autoimmunity* **41**, 126-139, doi:10.1016/j.jaut.2012.11.002 (2013).
- 243 Oo, Y. H., Hubscher, S. G. & Adams, D. H. Autoimmune hepatitis: new paradigms in the pathogenesis, diagnosis, and management. *Hepatology international* **4**, 475-493, doi:10.1007/s12072-010-9183-5 (2010).
- 244 Heneghan, M. A., Yeoman, A. D., Verma, S., Smith, A. D. & Longhi, M. S. Autoimmune hepatitis. *Lancet* **382**, 1433-1444, doi:10.1016/S0140-6736(12)62163-1 (2013).
- 245 Donaldson, P. T. Genetics of liver disease: immunogenetics and disease pathogenesis. *Gut* **53**, 599-608 (2004).
- 246 Hashimoto, E. *et al.* Immunohistochemical characterization of hepatic lymphocytes in primary biliary cirrhosis in comparison with primary sclerosing cholangitis and autoimmune chronic active hepatitis. *Mayo Clinic proceedings* **68**, 1049-1055 (1993).
- 247 Vergani, D., Longhi, M. S., Bogdanos, D. P., Ma, Y. & Mieli-Vergani, G. Autoimmune hepatitis. *Seminars in immunopathology* **31**, 421-435, doi:10.1007/s00281-009-0170-7 (2009).
- 248 Eggink, H. F., Houthoff, H. J., Huitema, S., Gips, C. H. & Poppema, S. Cellular and humoral immune reactions in chronic active liver disease. I. Lymphocyte subsets in liver biopsies of patients with untreated idiopathic autoimmune hepatitis, chronic active hepatitis B and primary biliary cirrhosis. *Clinical and experimental immunology* **50**, 17-24 (1982).
- 249 Hoshino, Y. *et al.* Limited usage of T-cell receptor beta chains and sequences of the complementarity determining region 3 of lymphocytes infiltrating in the liver of autoimmune hepatitis. *Hepatology* **22**, 142-147 (1995).

- 250 Alvarez, F. *et al.* International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *Journal of hepatology* **31**, 929-938 (1999).
- 251 Palioura, S., Herkel, J., Simonovic, M., Lohse, A. W. & Soll, D. Human SepSecS or SLA/LP: selenocysteine formation and autoimmune hepatitis. *Biological chemistry* **391**, 771-776, doi:10.1515/BC.2010.078 (2010).
- 252 Wies, I. *et al.* Identification of target antigen for SLA/LP autoantibodies in autoimmune hepatitis. *Lancet* **355**, 1510-1515 (2000).
- 253 Baeres, M. *et al.* Establishment of standardised SLA/LP immunoassays: specificity for autoimmune hepatitis, worldwide occurrence, and clinical characteristics. *Gut* **51**, 259-264 (2002).
- 254 Herkel, J. *et al.* Fine specificity of autoantibodies to soluble liver antigen and liver/pancreas. *Hepatology* **35**, 403-408, doi:10.1053/jhep.2002.30699 (2002).
- 255 Mix, H. *et al.* Identification of CD4 T-cell epitopes in soluble liver antigen/liver pancreas autoantigen in autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* **135**, 2107-2118, doi:10.1053/j.gastro.2008.07.029 (2008).
- 256 Zhao, Y. *et al.* Identification of T cell epitopes on soluble liver antigen in Chinese patients with auto-immune hepatitis. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* **31**, 721-729, doi:10.1111/j.1478-3231.2011.02487.x (2011).
- 257 Stechemesser, E., Klein, R. & Berg, P. A. Characterization and clinical relevance of liver-pancreas antibodies in autoimmune hepatitis. *Hepatology* **18**, 1-9 (1993).
- 258 Scheiffarth, F., Warnatz, H. & Niederer, W. [Animal experiment studies on the pathogenesis of chronic hepatitis. I. Morphological liver studies following sensitization with homologous liver cell fractions]. *Virchows Archiv fur pathologische Anatomie und Physiologie und fur klinische Medizin* **339**, 358-363 (1965).
- 259 Scheiffarth, F., Warnatz, H. & Mayer, K. Studies concerning the importance of mononuclear cells in the development of experimental hepatitis. *Journal of immunology* **98**, 396-401 (1967).
- 260 Mori, Y. *et al.* Study of cellular immunity in experimental autoimmune hepatitis in mice: transfer of spleen cells sensitized with liver proteins. *Clinical and experimental immunology* **61**, 577-584 (1985).
- 261 Manns, M., Gerken, G., Kyriatsoulis, A., Staritz, M. & Meyer zum Buschenfelde, K. H. Characterisation of a new subgroup of autoimmune chronic active hepatitis by autoantibodies against a soluble liver antigen. *Lancet* **1**, 292-294 (1987).
- 262 Lohse, A. W., Manns, M., Dienes, H. P., Meyer zum Buschenfelde, K. H. & Cohen, I. R. Experimental autoimmune hepatitis: disease induction, time course and T-cell reactivity. *Hepatology* **11**, 24-30 (1990).

- 263 Lohse, A. W., Brunner, S., Kyriatsoulis, A., Manns, M. & Meyer zum Buschenfelde, K. H. Autoantibodies in experimental autoimmune hepatitis. *Journal of hepatology* **14**, 48-53 (1992).
- 264 Cheruti, U. *Die Rolle der Autoimmunreaktion gegen das SLA/LP - Molekül bei autoimmuner Hepatitis*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, (2005).
- 265 Sebode, M. *T-Zell-Reaktionen bei Autoimmuner Hepatitis*, Universität Hamburg, (2010).
- 266 Kamanaka, M. *et al.* Memory/effector (CD45RB(lo)) CD4 T cells are controlled directly by IL-10 and cause IL-22-dependent intestinal pathology. *The Journal of experimental medicine* **208**, 1027-1040, doi:10.1084/jem.20102149 (2011).
- 267 Alfred Pingout, K. U. *Arbeitsmethoden der Biochemie*. 209-226 (Walter de Gruyter, Berlin, 1997).
- 268 Ishak, K. *et al.* Histological grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of hepatology* **22**, 696-699 (1995).
- 269 Bonecchi, R. *et al.* Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *The Journal of experimental medicine* **187**, 129-134 (1998).
- 270 Qin, S. *et al.* The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *The Journal of clinical investigation* **101**, 746-754, doi:10.1172/JCI1422 (1998).
- 271 Borojevic, R. *et al.* Stroma-mediated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) control of myelopoiesis: spatial organisation of intercellular interactions. *Cell and tissue research* **313**, 55-62, doi:10.1007/s00441-003-0726-0 (2003).
- 272 Bettelli, E. *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235-238, doi:10.1038/nature04753 (2006).
- 273 Bettelli, E., Korn, T. & Kuchroo, V. K. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Current opinion in immunology* **19**, 652-657, doi:10.1016/j.coi.2007.07.020 (2007).
- 274 Louis, H. *et al.* Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Hepatology* **28**, 1607-1615, doi:10.1002/hep.510280621 (1998).
- 275 Gazzinelli, R. T. *et al.* In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *Journal of immunology* **157**, 798-805 (1996).

- 276 Seki, E. *et al.* TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nature medicine* **13**, 1324-1332, doi:10.1038/nm1663 (2007).
- 277 Agata, Y. *et al.* Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *International immunology* **8**, 765-772 (1996).
- 278 Kassel, R. *et al.* Chronically inflamed livers up-regulate expression of inhibitory B7 family members. *Hepatology* **50**, 1625-1637, doi:10.1002/hep.23173 (2009).
- 279 Klugewitz, K. *et al.* Differentiation-dependent and subset-specific recruitment of T-helper cells into murine liver. *Hepatology* **35**, 568-578, doi:10.1053/jhep.2002.31310 (2002).
- 280 Hamann, A., Klugewitz, K., Austrup, F. & Jablonski-Westrich, D. Activation induces rapid and profound alterations in the trafficking of T cells. *European journal of immunology* **30**, 3207-3218, doi:10.1002/1521-4141(200011)30:11<3207::AID-IMMU3207>3.0.CO;2-L (2000).
- 281 D'Amico, G. *et al.* Uncoupling of inflammatory chemokine receptors by IL-10: generation of functional decoys. *Nature immunology* **1**, 387-391, doi:10.1038/80819 (2000).
- 282 Takayama, T. *et al.* Mammalian and viral IL-10 enhance C-C chemokine receptor 5 but down-regulate C-C chemokine receptor 7 expression by myeloid dendritic cells: impact on chemotactic responses and in vivo homing ability. *Journal of immunology* **166**, 7136-7143 (2001).
- 283 Chang, C. H., Furue, M. & Tamaki, K. Selective regulation of ICAM-1 and major histocompatibility complex class I and II molecule expression on epidermal Langerhans cells by some of the cytokines released by keratinocytes and T cells. *European journal of immunology* **24**, 2889-2895, doi:10.1002/eji.1830241146 (1994).
- 284 Rowbottom, A. W., Lepper, M. A., Garland, R. J., Cox, C. V. & Corley, E. G. Interleukin-10-induced CD8 cell proliferation. *Immunology* **98**, 80-89 (1999).
- 285 Ye, Z. *et al.* IL-10 has a distinct immunoregulatory effect on naive and active T cell subsets. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **27**, 1031-1038, doi:10.1089/jir.2006.0144 (2007).
- 286 Peguet-Navarro, J. *et al.* Interleukin-10 inhibits the primary allogeneic T cell response to human epidermal Langerhans cells. *European journal of immunology* **24**, 884-891, doi:10.1002/eji.1830240416 (1994).
- 287 Koch, F. *et al.* High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *The Journal of experimental medicine* **184**, 741-746 (1996).

- 288 Chatelain, R. *et al.* IL-10 inhibits ICAM-1 expression on human Langerhans cells but not on keratinocytes, dermal endothelial cells or fibroblasts. *Archives of dermatological research* **290**, 477-482 (1998).
- 289 Mitra, R. S., Judge, T. A., Nestle, F. O., Turka, L. A. & Nickoloff, B. J. Psoriatic skin-derived dendritic cell function is inhibited by exogenous IL-10. Differential modulation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression. *Journal of immunology* **154**, 2668-2677 (1995).
- 290 Chang, C. H., Furue, M. & Tamaki, K. B7-1 expression of Langerhans cells is up-regulated by proinflammatory cytokines, and is down-regulated by interferon-gamma or by interleukin-10. *European journal of immunology* **25**, 394-398, doi:10.1002/eji.1830250213 (1995).
- 291 Ozawa, H., Aiba, S., Nakagawa & Tagami, H. Interferon-gamma and interleukin-10 inhibit antigen presentation by Langerhans cells for T helper type 1 cells by suppressing their CD80 (B7-1) expression. *European journal of immunology* **26**, 648-652, doi:10.1002/eji.1830260321 (1996).
- 292 Buelens, C. *et al.* Interleukin-10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells. *European journal of immunology* **25**, 2668-2672, doi:10.1002/eji.1830250940 (1995).
- 293 de Waal Malefyt, R., Yssel, H. & de Vries, J. E. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *Journal of immunology* **150**, 4754-4765 (1993).
- 294 Groux, H., Bigler, M., de Vries, J. E. & Roncarolo, M. G. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *The Journal of experimental medicine* **184**, 19-29 (1996).
- 295 Wilke, C. M. *et al.* Endogenous interleukin-10 constrains Th17 cells in patients with inflammatory bowel disease. *Journal of translational medicine* **9**, 217, doi:10.1186/1479-5876-9-217 (2011).
- 296 Zhou, F. *et al.* IL-10 deficiency blocks the ability of LPS to regulate expression of tolerance-related molecules on dendritic cells. *European journal of immunology* **42**, 1449-1458, doi:10.1002/eji.201141733 (2012).
- 297 El-behi, M. *et al.* Differential effect of IL-27 on developing versus committed Th17 cells. *Journal of immunology* **183**, 4957-4967, doi:10.4049/jimmunol.0900735 (2009).
- 298 Fitzgerald, D. C. *et al.* Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells. *Nature immunology* **8**, 1372-1379, doi:10.1038/ni1540 (2007).

- 299 Stumhofer, J. S. *et al.* Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nature immunology* **7**, 937-945, doi:10.1038/ni1376 (2006).
- 300 Stumhofer, J. S. *et al.* Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nature immunology* **8**, 1363-1371, doi:10.1038/ni1537 (2007).
- 301 Batten, M. *et al.* Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nature immunology* **7**, 929-936, doi:10.1038/ni1375 (2006).
- 302 Murugaiyan, G. *et al.* IL-27 is a key regulator of IL-10 and IL-17 production by human CD4+ T cells. *Journal of immunology* **183**, 2435-2443, doi:10.4049/jimmunol.0900568 (2009).
- 303 D'Andrea, A. *et al.* Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *The Journal of experimental medicine* **178**, 1041-1048 (1993).
- 304 He, Q. *et al.* Molecular basis for the potency of IL-10-deficient dendritic cells as a highly efficient APC system for activating Th1 response. *Journal of immunology* **174**, 4860-4869 (2005).
- 305 Shi, G. *et al.* Phenotype switching by inflammation-inducing polarized Th17 cells, but not by Th1 cells. *Journal of immunology* **181**, 7205-7213 (2008).
- 306 Lukens, J. R., Barr, M. J., Chaplin, D. D., Chi, H. & Kanneganti, T. D. Inflammasome-derived IL-1beta regulates the production of GM-CSF by CD4(+) T cells and gammadelta T cells. *Journal of immunology* **188**, 3107-3115, doi:10.4049/jimmunol.1103308 (2012).
- 307 Cravens, P. D. *et al.* Lymph node-derived donor encephalitogenic CD4+ T cells in C57BL/6 mice adoptive transfer experimental autoimmune encephalomyelitis highly express GM-CSF and T-bet. *Journal of neuroinflammation* **8**, 73, doi:10.1186/1742-2094-8-73 (2011).
- 308 Joss, A., Akdis, M., Faith, A., Blaser, K. & Akdis, C. A. IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway. *European journal of immunology* **30**, 1683-1690, doi:10.1002/1521-4141(200006)30:6<1683::AID-IMMU1683>3.0.CO;2-A (2000).
- 309 Taga, K., Mostowski, H. & Tosato, G. Human interleukin-10 can directly inhibit T-cell growth. *Blood* **81**, 2964-2971 (1993).
- 310 Naundorf, S. *et al.* IL-10 interferes directly with TCR-induced IFN-gamma but not IL-17 production in memory T cells. *European journal of immunology* **39**, 1066-1077, doi:10.1002/eji.200838773 (2009).

- 311 Hoffman, B. E. *et al.* Nonredundant roles of IL-10 and TGF-beta in suppression of immune responses to hepatic AAV-factor IX gene transfer. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **19**, 1263-1272, doi:10.1038/mt.2011.33 (2011).
- 312 Itoh, Y. *et al.* Clinical significance of elevated serum interferon- inducible protein-10 levels in hepatitis C virus carriers with persistently normal serum transaminase levels. *Journal of viral hepatitis* **8**, 341-348 (2001).
- 313 Middleton, J., Patterson, A. M., Gardner, L., Schmutz, C. & Ashton, B. A. Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood* **100**, 3853-3860, doi:10.1182/blood.V100.12.3853 (2002).
- 314 Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C. R. & Lanzavecchia, A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* **187**, 875-883 (1998).
- 315 Farber, J. M. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *Journal of leukocyte biology* **61**, 246-257 (1997).
- 316 Park, J. W. *et al.* Primary hepatocytes from mice treated with IL-2/IL-12 produce T cell chemoattractant activity that is dependent on monokine induced by IFN-gamma (Mig) and chemokine responsive to gamma-2 (Crg-2). *Journal of immunology* **166**, 3763-3770 (2001).
- 317 Farber, J. M. A macrophage mRNA selectively induced by gamma-interferon encodes a member of the platelet factor 4 family of cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 5238-5242 (1990).
- 318 Majumder, S. *et al.* p48/STAT-1alpha-containing complexes play a predominant role in induction of IFN-gamma-inducible protein, 10 kDa (IP-10) by IFN-gamma alone or in synergy with TNF-alpha. *Journal of immunology* **161**, 4736-4744 (1998).
- 319 Helbig, K. J. *et al.* Expression of the CXCR3 ligand I-TAC by hepatocytes in chronic hepatitis C and its correlation with hepatic inflammation. *Hepatology* **39**, 1220-1229, doi:10.1002/hep.20167 (2004).
- 320 Cassatella, M. A., Meda, L., Bonora, S., Ceska, M. & Constantin, G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *The Journal of experimental medicine* **178**, 2207-2211 (1993).
- 321 Loetscher, P. *et al.* CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* **391**, 344-345, doi:10.1038/34812 (1998).

- 322 Schall, T. J., Bacon, K., Toy, K. J. & Goeddel, D. V. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* **347**, 669-671, doi:10.1038/347669a0 (1990).
- 323 Taub, D. D., Conlon, K., Lloyd, A. R., Oppenheim, J. J. & Kelvin, D. J. Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science* **260**, 355-358 (1993).
- 324 Morland, C. M., Fear, J., McNab, G., Joplin, R. & Adams, D. H. Promotion of leukocyte transendothelial cell migration by chemokines derived from human biliary epithelial cells in vitro. *Proceedings of the Association of American Physicians* **109**, 372-382 (1997).
- 325 Ivanov, I. I. *et al.* The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* **126**, 1121-1133, doi:10.1016/j.cell.2006.07.035 (2006).
- 326 Acosta-Rodriguez, E. V. *et al.* Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nature immunology* **8**, 639-646, doi:10.1038/ni1467 (2007).
- 327 Yamazaki, T. *et al.* CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells. *Journal of immunology* **181**, 8391-8401 (2008).
- 328 Marra, F. & Tacke, F. Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology* **147**, 577-594 e571, doi:10.1053/j.gastro.2014.06.043 (2014).
- 329 Kasama, T., Strieter, R. M., Lukacs, N. W., Burdick, M. D. & Kunkel, S. L. Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10. *Journal of immunology* **152**, 3559-3569 (1994).
- 330 Scapini, P. *et al.* Neutrophils produce biologically active macrophage inflammatory protein-3alpha (MIP-3alpha)/CCL20 and MIP-3beta/CCL19. *European journal of immunology* **31**, 1981-1988, doi:10.1002/1521-4141(200107)31:7<1981::AID-IMMU1981>3.0.CO;2-X (2001).
- 331 Martinez, G. J., Nurieva, R. I., Yang, X. O. & Dong, C. Regulation and function of proinflammatory TH17 cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1143**, 188-211, doi:10.1196/annals.1443.021 (2008).
- 332 Mehal, W. Z., Juedes, A. E. & Crispe, I. N. Selective retention of activated CD8+ T cells by the normal liver. *Journal of immunology* **163**, 3202-3210 (1999).
- 333 Crane, I. J. *et al.* Involvement of CCR5 in the passage of Th1-type cells across the blood-retina barrier in experimental autoimmune uveitis. *Journal of leukocyte biology* **79**, 435-443, doi:10.1189/jlb.0305130 (2006).
- 334 Boyd, A. W., Wawryk, S. O., Burns, G. F. & Fecondo, J. V. Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) has a central role in cell-cell contact-mediated immune

- mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 3095-3099 (1988).
- 335 Chan, P. Y. & Aruffo, A. VLA-4 integrin mediates lymphocyte migration on the inducible endothelial cell ligand VCAM-1 and the extracellular matrix ligand fibronectin. *The Journal of biological chemistry* **268**, 24655-24664 (1993).
- 336 Scoazec, J. Y. & Feldmann, G. The cell adhesion molecules of hepatic sinusoidal endothelial cells. *Journal of hepatology* **20**, 296-300 (1994).
- 337 Emoto, M. *et al.* Increased resistance of LFA-1-deficient mice to lipopolysaccharide-induced shock/liver injury in the presence of TNF-alpha and IL-12 is mediated by IL-10: a novel role for LFA-1 in the regulation of the proinflammatory and anti-inflammatory cytokine balance. *Journal of immunology* **171**, 584-593 (2003).
- 338 Alcaide, P. *et al.* Difference in Th1 and Th17 lymphocyte adhesion to endothelium. *Journal of immunology* **188**, 1421-1430, doi:10.4049/jimmunol.1101647 (2012).
- 339 Bonder, C. S. *et al.* Rules of recruitment for Th1 and Th2 lymphocytes in inflamed liver: a role for alpha-4 integrin and vascular adhesion protein-1. *Immunity* **23**, 153-163, doi:10.1016/j.immuni.2005.06.007 (2005).
- 340 Schiffenbauer, J. *et al.* The induction of EAE is only partially dependent on TNF receptor signaling but requires the IL-1 type I receptor. *Clinical immunology* **95**, 117-123, doi:10.1006/clim.2000.4851 (2000).
- 341 Sutton, C., Brereton, C., Keogh, B., Mills, K. H. & Lavelle, E. C. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of experimental medicine* **203**, 1685-1691, doi:10.1084/jem.20060285 (2006).
- 342 Aggarwal, S. & Gurney, A. L. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *Journal of leukocyte biology* **71**, 1-8 (2002).
- 343 Streetz, K. L., Luedde, T., Manns, M. P. & Trautwein, C. Interleukin 6 and liver regeneration. *Gut* **47**, 309-312 (2000).
- 344 Langrish, C. L. *et al.* IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunological reviews* **202**, 96-105, doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00214.x (2004).
- 345 Lankford, C. S. & Frucht, D. M. A unique role for IL-23 in promoting cellular immunity. *Journal of leukocyte biology* **73**, 49-56 (2003).
- 346 Wang, Q. *et al.* Hepatitis B virus induces IL-23 production in antigen presenting cells and causes liver damage via the IL-23/IL-17 axis. *PLoS pathogens* **9**, e1003410, doi:10.1371/journal.ppat.1003410 (2013).

- 347 Murphy, C. A. *et al.* Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine* **198**, 1951-1957, doi:10.1084/jem.20030896 (2003).
- 348 Cua, D. J. *et al.* Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* **421**, 744-748, doi:10.1038/nature01355 (2003).
- 349 Yen, D. *et al.* IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *The Journal of clinical investigation* **116**, 1310-1316, doi:10.1172/JCI21404 (2006).
- 350 Langrish, C. L. *et al.* IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine* **201**, 233-240, doi:10.1084/jem.20041257 (2005).
- 351 Mangan, P. R. *et al.* Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* **441**, 231-234, doi:10.1038/nature04754 (2006).
- 352 Hamilton, J. A. & Anderson, G. P. GM-CSF Biology. *Growth factors* **22**, 225-231, doi:10.1080/08977190412331279881 (2004).
- 353 Inaba, K. *et al.* Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of experimental medicine* **176**, 1693-1702 (1992).
- 354 Inaba, K. *et al.* Identification of proliferating dendritic cell precursors in mouse blood. *The Journal of experimental medicine* **175**, 1157-1167 (1992).
- 355 McQualter, J. L. *et al.* Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine* **194**, 873-882 (2001).
- 356 Sonderegger, I. *et al.* GM-CSF mediates autoimmunity by enhancing IL-6-dependent Th17 cell development and survival. *The Journal of experimental medicine* **205**, 2281-2294, doi:10.1084/jem.20071119 (2008).
- 357 Campbell, I. K. *et al.* Protection from collagen-induced arthritis in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. *Journal of immunology* **161**, 3639-3644 (1998).
- 358 al-Wabel, A., al-Knawy, B. & Raziuddin, S. Interleukin-8 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secretion in hepatocellular carcinoma and viral chronic active hepatitis. *Clinical immunology and immunopathology* **74**, 231-235 (1995).
- 359 Wu, Y., Lin, Y., Hou, W., Wang, Y. & Sun, B. IFN-gamma up-regulation of IL-12 beta 2 receptor is associated with experimental autoimmune uveitis susceptible B10.A mice, but not in EAU resistant BALB/c mice. *Journal of neuroimmunology* **137**, 154-163 (2003).

- 360 Macatonia, S. E., Doherty, T. M., Knight, S. C. & O'Garra, A. Differential effect of IL-10 on dendritic cell-induced T cell proliferation and IFN-gamma production. *Journal of immunology* **150**, 3755-3765 (1993).
- 361 Lobo-Yeo, A. *et al.* Class I and class II major histocompatibility complex antigen expression on hepatocytes: a study in children with liver disease. *Hepatology* **12**, 224-232 (1990).
- 362 Knolle, P. A. *et al.* Interleukin-10 expression is autoregulated at the transcriptional level in human and murine Kupffer cells. *Hepatology* **27**, 93-99, doi:10.1002/hep.510270116 (1998).
- 363 Creery, W. D., Diaz-Mitoma, F., Fillion, L. & Kumar, A. Differential modulation of B7-1 and B7-2 isoform expression on human monocytes by cytokines which influence the development of T helper cell phenotype. *European journal of immunology* **26**, 1273-1277, doi:10.1002/eji.1830260614 (1996).
- 364 de Waal Malefyt, R. *et al.* Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *The Journal of experimental medicine* **174**, 915-924 (1991).
- 365 Willems, F. *et al.* Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *European journal of immunology* **24**, 1007-1009, doi:10.1002/eji.1830240435 (1994).
- 366 De Biasio, M. B. *et al.* Liver infiltrating mononuclear cells in children with type 1 autoimmune hepatitis. *Journal of clinical pathology* **59**, 417-423, doi:10.1136/jcp.2005.028613 (2006).
- 367 Ichiki, Y. *et al.* T cell immunity in autoimmune hepatitis. *Autoimmunity reviews* **4**, 315-321, doi:10.1016/j.autrev.2005.01.005 (2005).
- 368 Suzuki, Y. *et al.* Peripheral CD8+/CD25+ lymphocytes may be implicated in hepatocellular injuries in patients with acute-onset autoimmune hepatitis. *Journal of gastroenterology* **39**, 649-653, doi:10.1007/s00535-003-1360-z (2004).
- 369 Longhi, M. S. *et al.* Functional study of CD4+CD25+ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis. *Journal of immunology* **176**, 4484-4491 (2006).
- 370 Schlaak, J. F., Lohr, H., Gallati, H., Meyer zum Buschenfelde, K. H. & Fleischer, B. Analysis of the in vitro cytokine production by liver-infiltrating T cells of patients with autoimmune hepatitis. *Clinical and experimental immunology* **94**, 168-173 (1993).
- 371 Senaldi, G., Portmann, B., Mowat, A. P., Mieli-Vergani, G. & Vergani, D. Immunohistochemical features of the portal tract mononuclear cell infiltrate in chronic aggressive hepatitis. *Archives of disease in childhood* **67**, 1447-1453 (1992).

- 372 Harada, K. *et al.* In situ nucleic acid hybridization of cytokines in primary biliary cirrhosis: predominance of the Th1 subset. *Hepatology* **25**, 791-796, doi:10.1002/hep.510250402 (1997).
- 373 Bettelli, E. *et al.* IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. *Journal of immunology* **161**, 3299-3306 (1998).
- 374 Mizuhara, H. *et al.* Critical involvement of interferon gamma in the pathogenesis of T-cell activation-associated hepatitis and regulatory mechanisms of interleukin-6 for the manifestations of hepatitis. *Hepatology* **23**, 1608-1615, doi:10.1053/jhep.1996.v23.pm0008675184 (1996).
- 375 Kusters, S., Gantner, F., Kunstle, G. & Tiegs, G. Interferon gamma plays a critical role in T cell-dependent liver injury in mice initiated by concanavalin A. *Gastroenterology* **111**, 462-471 (1996).
- 376 Tiegs, G. Cellular and cytokine-mediated mechanisms of inflammation and its modulation in immune-mediated liver injury. *Zeitschrift fur Gastroenterologie* **45**, 63-70, doi:10.1055/s-2006-927397 (2007).
- 377 Miossec, P., Korn, T. & Kuchroo, V. K. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *The New England journal of medicine* **361**, 888-898, doi:10.1056/NEJMra0707449 (2009).
- 378 Jager, A., Dardalhon, V., Sobel, R. A., Bettelli, E. & Kuchroo, V. K. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *Journal of immunology* **183**, 7169-7177, doi:10.4049/jimmunol.0901906 (2009).
- 379 Lee, Y. *et al.* Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nature immunology* **13**, 991-999, doi:10.1038/ni.2416 (2012).
- 380 Kim, C. H., Johnston, B. & Butcher, E. C. Trafficking machinery of NKT cells: shared and differential chemokine receptor expression among V alpha 24(+)V beta 11(+) NKT cell subsets with distinct cytokine-producing capacity. *Blood* **100**, 11-16, doi:10.1182/blood-2001-12-0196 (2002).
- 381 Gershwin, M. E., Vierling, J. M. & Manns, M. P. *Liver Immunology*. Second edn, (New York Heidelberg Dordrecht London: Springer Science+Business Media, 2014).
- 382 Godfrey, D. I., Stankovic, S. & Baxter, A. G. Raising the NKT cell family. *Nature immunology* **11**, 197-206, doi:10.1038/ni.1841 (2010).
- 383 Bendelac, A., Savage, P. B. & Teyton, L. The biology of NKT cells. *Annual review of immunology* **25**, 297-336, doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141711 (2007).
- 384 Bendelac, A., Rivera, M. N., Park, S. H. & Roark, J. H. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annual review of immunology* **15**, 535-562, doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.535 (1997).

- 385 Christen, U. & von Herrath, M. G. Initiation of autoimmunity. *Current opinion in immunology* **16**, 759-767, doi:10.1016/j.coi.2004.09.002 (2004).
- 386 Wagner, N. & Dannecker, G. *Pädiatrische Rheumatologie*. 2. überarbeitete edn, (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2014).
- 387 Son, G., Kremer, M. & Hines, I. N. Contribution of gut bacteria to liver pathobiology. *Gastroenterology research and practice* **2010**, doi:10.1155/2010/453563 (2010).
- 388 Cusick, M. F., Libbey, J. E. & Fujinami, R. S. Molecular mimicry as a mechanism of autoimmune disease. *Clinical reviews in allergy & immunology* **42**, 102-111, doi:10.1007/s12016-011-8293-8
10.1007/s12016-011-8294-7 (2012).
- 389 Delogu, L. G., Deidda, S., Delitala, G. & Manetti, R. Infectious diseases and autoimmunity. *Journal of infection in developing countries* **5**, 679-687 (2011).
- 390 Ercolini, A. M. & Miller, S. D. The role of infections in autoimmune disease. *Clinical and experimental immunology* **155**, 1-15, doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03834.x (2009).
- 391 Sellon, R. K. *et al.* Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infection and immunity* **66**, 5224-5231 (1998).
- 392 Gomes-Santos, A. C. *et al.* New insights into the immunological changes in IL-10-deficient mice during the course of spontaneous inflammation in the gut mucosa. *Clinical & developmental immunology* **2012**, 560817, doi:10.1155/2012/560817 (2012).
- 393 Berg, R. D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends in microbiology* **3**, 149-154 (1995).
- 394 Saich, R. & Chapman, R. Primary sclerosing cholangitis, autoimmune hepatitis and overlap syndromes in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology : WJG* **14**, 331-337 (2008).
- 395 Chapman, R. *et al.* Diagnosis and management of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* **51**, 660-678, doi:10.1002/hep.23294 (2010).
- 396 Gregorio, G. V. *et al.* Autoimmune hepatitis/sclerosing cholangitis overlap syndrome in childhood: a 16-year prospective study. *Hepatology* **33**, 544-553, doi:10.1053/jhep.2001.22131 (2001).
- 397 Woodward, J. & Neuberger, J. Autoimmune overlap syndromes. *Hepatology* **33**, 994-1002, doi:10.1053/jhep.2001.23316 (2001).
- 398 Floreani, A. *et al.* Clinical course and outcome of autoimmune hepatitis/primary sclerosing cholangitis overlap syndrome. *The American journal of gastroenterology* **100**, 1516-1522, doi:10.1111/j.1572-0241.2005.41841.x (2005).

7.2 Abkürzungsverzeichnis

ACK	Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat
AIH	Autoimmune Hepatitis
AK	Antikörper
ANA	antinukleäre Antikörper
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen-präsentierende Zelle
BEC	biliäre Epithelzelle
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CD	Unterscheidungsgruppen (<i>Cluster of Differentiation</i>)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dnIL-10R α	dominant-negativer IL-10 Rezeptor α
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
CFA	Komplettes Freund`s Adjuvant
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis
ConA	Concanavalin A
ct	<i>cycle threshold</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4</i>
DC	Dendritische Zelle
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EAE	Experimentelle autoimmune Encephalomyelitis
EAH	Experimentelle autoimmune Hepatitis
EAU	Experimentelle Autoimmun-Uveitis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FAM	6-Carboxyfluorescein
Fc	Komplementprotein
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
Foxp3	<i>forkhead/winged helix</i> Transkriptionsfaktor
g	Gramm

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
h	Stunde
HE	Hämatoxilin-Eosin
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium
KC	Kupferzelle
kg	Kilogramm
ko	<i>knock-out</i>
L	Liter
LFA-1	<i>Lymphocyte Function-associated Antigen-1</i>
LKM-1	<i>Liver-Kidney Microsome type 1</i>
LP	Leber/Pankreas
LPS	Lipopolysaccharid
LSEC	Sinuosoidale Endothelzelle der Leber
M	Molar
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MGB	<i>Minor Groove Binder</i>
mHAI	modifizierter histologischer Aktivitätsindex
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
min	Minute
mL	Milliliter
µL	Mikroliter
mM	Millimol
µm	Mikrometer
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>)
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle

NKT-Zelle	Natürliche Killer-T-Zelle
ns	nicht signifikant
OD	optische Dichte
PacO-NHS	Pacific Orange Succinidyl Ester
PAMP	Pathogen-assoziierte Muster (<i>Pathogen-Associated Microbial Patterns</i>)
PBC	primär biliäre Zirrhose
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PD-1	<i>Programmed Death Receptor 1</i>
PD-L1	<i>Programmed Death-Ligand 1</i>
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
PSC	primär sklerosierende Cholangitis
qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
R	Rezeptor
RA	Rheumatoide Arthritis
RNA	Ribonukleinsäure
RORyt	<i>retinoic acid-related orphan receptor gamma-t</i>
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
sec	Sekunden
SepSecS	O-Phosphoseryl-tRNA:SelenocysteinyI-tRNA-Synthase
SLA	lösliches Leberantigen (<i>Soluble Liver Antigen</i>)
SMA	Autoantikörper gegen die glatte Muskulatur (<i>smooth muscle antibody</i>)
SPF	spezifisch Pathogen-frei
TCR	T-Zellrezeptor
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
T _H	T Helfer

TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor Nekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zelle
U	<i>Unit</i>
VAP-1	<i>Vascular Adhesion Protein-1</i>
VCAM-1	<i>Vascular Adhesion Molecule 1</i>
VE-Wasser	voll entsalztes Wasser
z.B.	zum Beispiel

7.3 Kongressbeiträge

European Congress of Immunology, ECI, Glasgow, 2012

SepSecS-induced T_H17-associated autoimmune hepatitis in mice

Jessica Rauch, Falko Schulte, Marcial Sebode, Antonella Carambia, Ansgar w. Lohse, Christina Weiler-Normann, Johannes Herkel

63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, AASLD, Boston, 2012

SepSecS-induced T_H17-associated autoimmune hepatitis in mice

Jessica Rauch, Falko Schulte, Marcial Sebode, Antonella Carambia, Ansgar w. Lohse, Christina Weiler-Normann, Johannes Herkel

7.4 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. Ansgar W. Lohse, Direktor der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik, möchte ich mich für die freundliche Aufnahme in seiner Klinik und für die Möglichkeit bedanken, die vorliegende Arbeit in seinem Labor anfertigen zu können.

Prof. Dr. Susanne Dobler danke ich für die Begutachtung dieser Arbeit und für Ihre Bereitschaft darüber hinaus die Begutachtung der Disputation zu übernehmen.

Ein besonderes Dankeschön gilt Herrn PD Dr. Johannes Herkel für die wissenschaftliche Betreuung meiner Doktorarbeit, den Freiraum bei der Gestaltung des Projekts, die intensive Unterstützung und das Vertrauen in meine Fähigkeiten. Ebenso danke ich Frau Dr. med. Christina Weiler-Normann für die herzliche Betreuung und die La-Ola-Wellen. Darüber hinaus möchte ich mich bei Dr. Antonella Carambia für die konstruktiven wissenschaftlichen Anregungen und ihre Diskussionsbereitschaft bedanken.

Herrn Dr. A. Quaas danke ich für die histologische Beurteilung der Leberschnitte.

Ein ganz herzliches Dankeschön gilt Dr. Anke Osterloh, Dr. Tanja Schoknecht und Dr. Julia Templin für ihr Engagement beim Korrekturlesen dieser Arbeit sowie ihren Optimismus und Zuspruch.

Bei allen Kollegen möchte ich mich für die vielen praktischen Tipps, die freundliche Atmosphäre, den Spaß bei der Arbeit und die gemeinsamen Unternehmungen bedanken. Marko Hilken gebührt ein großer Dank, der insbesondere bei Computerproblemen immer der erste Ansprechpartner war und mir mit Rat und Tat zur Seite stand. Auch danke ich Agnes Malotta und Tina Trabandt für ihre jederzeit hilfreiche Unterstützung im Laboralltag.

Ein ganz besonderer Dank gilt Tanja Schoknecht, Claudia Bovensiepen, Nina Günther und Jan-Hendrik Kozik für ihre Freundschaft und die gemeinsame Doktorandenzeit, in der wir alle Höhen wie auch Tiefen gemeinsam gemeistert haben.

Außerdem danke ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung und für ihren Rückhalt. Sie haben für den nötigen Ausgleich gesorgt und mich dadurch stets motiviert.

Schließlich danke ich von ganzem Herzen meinem Freund Sven, der auf viel gemeinsame Zeit verzichten musste, mir stets Mut zugesprochen, mich in meiner Arbeit bestärkt und an mich geglaubt hat.

7.5 Eidesstattliche Erklärung

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

Hamburg, den 18. Dezember 2014

Nachname: Rauch Vorname: Jessica

Unterschrift: _____