

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

I. Medizinische Klinik und Poliklinik

Direktor: Prof. Dr. Ansgar W. Lohse

Untersuchung von Mechanismen der hepatischen Immuntoleranz im Tiermodell der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis

Dissertation

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

vorgelegt von

Lisa Beatrice Leypoldt
aus Braunschweig

Hamburg 2019

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 05.11.2019**

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Johannes Herkel

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Linda Diehl

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Die Leber in ihrer immunologischen Funktion	1
1.2	Antigenpräsentierende Zellen in der Leber	1
1.3	Differenzierung von CD4+ T-Zellen	3
1.3.1	T regulatorische Zellen	5
1.3.2	Typ 1 regulatorische T Zellen	6
1.4	TGF- β und IL-10 als antientzündliche Zytokine in der Leber.....	8
1.5	Die koinhibitorischen Zellmembranproteine CTLA-4 und PD-1	11
1.6	Multiple Sklerose und das Tiermodell der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis.....	13
1.6.1	Hepatisch induzierte Toleranz im EAE-Modell.....	14
1.7	Zielsetzung	15
2.	Material und Methoden	17
2.1	Geräte.....	17
2.2	Materialien	17
2.3	qPCR-Sonden	19
2.4	Kits.....	20
2.5	Durchflusszytometrie – Antikörper.....	20
2.6	Puffer	21
2.7	Software	21
2.8	Versuchstiere.....	22
2.9	Aufreinigung der Zellpopulationen.....	23
2.9.1	Isolation von CD4+ T-Lymphozyten aus der Milz und aus dem Thymus	23
2.9.2	Isolation von CD4+CD25+ und CD4+CD25- T-Lymphozyten aus der Milz	23
2.9.3	Isolation von CD11c+ dendritischen Zellen (DC) aus der Milz.....	24
2.9.4	Isolation nichtparenchymatöser Zellen (NPC) aus der Leber	24
2.10	Zellkultur	25
2.10.1	Zellzahlbestimmung	25
2.10.2	Zellkulturmedien.....	25
2.10.3	Restimulation der Zellen zur Detektion von Zytokinen im Zell- kulturüberstand	25
2.11	Charakterisierung der Zellen	26
2.11.1	Ausschluss toter Zellen	26
2.11.2	Färbung von Oberflächenmarkern	26
2.11.3	Färbung von CD4+CD25+Foxp3+ regulatorischen T-Zellen	26
2.11.4	Färbung von T-Zellen des CD49b+Lag-3+ Typ 1 regulatorischen Phänotyps	26
2.11.5	Färbung von tiger-Maus-Zellen.....	27
2.11.6	Durchflusszytometrie	27
2.11.7	Bestimmung der Anzahl Leber-infiltrierender CD4+ T-Zellen	27
2.11.8	Zytokinbestimmung im Zellkulturüberstand mittels ELISA.....	27
2.12	Genexpressionsanalyse	28

2.12.1	RNA-Extraktion und Konzentrationsbestimmung.....	28
2.12.2	Umschreibung in cDNA.....	28
2.12.3	Messung der Genexpression mittels quantitativer Real-Time-PCR (rt-qPCR).....	29
2.12.4	Berechnung der relativen Expression mittels der Δ Ct-Methode	30
2.13	Histologie	30
2.13.1	Fixierung, Entwässerung und Einbettung der Proben	30
2.13.2	Schnitte und Hämatoxylin-Eosin-Färbung	30
2.14	Tiermodell der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE)	31
2.14.1	MBP-Immunisierung	31
2.14.2	Beurteilung der EAE	31
2.14.3	Autoimmune Hepatitis im Mausmodell.....	31
2.14.3.1	Auswertungsstrategie zur Beurteilung des Entzündungs- status in der Leber	31
2.14.3.2	Serum-Transaminasenmessung.....	31
2.14.4	Adoptiver Zelltransfer Antigen-spezifischer CD4+ T-Zellen <i>in vivo</i> ...	32
2.14.5	<i>In vivo</i> Treg-Depletion mittels Injektion von anti-mouse-CD25- Antikörper.....	32
2.14.6	<i>In vivo</i> IL-10-Rezeptor-Blockade mittels Injektion von anti-IL-10- Rezeptor-Antikörper.....	32
2.14.7	<i>In vivo</i> PD-1-Blockade mittels Injektion von anti-mouse-CD279 (PD-1)-Antikörper.....	33
2.14.8	<i>In vivo</i> CTLA-4-Blockade mittels Injektion von anti-mouse-CTLA-4- Antikörper.....	33
2.15	Statistische Auswertung	33
3.	Ergebnisse.....	34
3.1	Charakterisierung des CRP-MBP x tg4 Mausmodells	34
3.1.1	<i>In vitro</i> Funktionalitätsprüfung von Zellen der CRP-MBP x tg4 Linie	35
3.1.2	<i>In vivo</i> Funktionalitätsprüfung von Zellen der CRP-MBP x tg4 Linie	37
3.1.3	Bedeutung von hepatisch induzierten T regulatorischen Zellen für die periphere Toleranz	40
3.2	Charakterisierung von tg4 Zellen nach adoptivem Zelltransfer in CRP-MBP x B10.PL Mäuse	44
3.2.1	Induktion eines Tr1-ähnlichen Phänotyps.....	45
3.2.2	Genexpressionsanalysen im Zusammenhang mit dem Tr1- Phänotyp	49
3.2.3	Korrelation von Zytokinproduktion und Tr1-Phänotyp in IL10gfp Reporter-Mäusen	51
3.3	Inhibierung suppressiver Signalwege zur Durchbrechung der hepatisch induzierten Toleranz	53
3.3.1	Inhibierung des IL-10-Signalweges <i>in vivo</i>	53
3.3.2	Kombinierte Inhibition der IL-10- und TGF- β -Signalwege.....	54
3.4	Charakterisierung der inhibitorischen Oberflächenmoleküle PD-1 und CTLA-4	56
3.4.1	Analysen der Genexpression	56
3.4.2	Durchflusszytometrische Untersuchungen	57

3.4.3	Inhibition der Oberflächenmoleküle PD-1 und CTLA-4 <i>in vivo</i>	60
4.	Diskussion	62
4.1	Charakterisierung des CRP-MBP x tg4 Mausmodells und Untersuchung der Rolle von CD4+CD25+ T regulatorischen Zellen für die hepatische Toleranz.....	62
4.2	Charakterisierung von MBP-spezifischen CD4+ Effektor T Zellen nach adoptivem Zelltransfer in CRP-MBP x B10.PL Mäusen und Untersuchung Treg-unabhängiger Mechanismen der hepatischen Immuntoleranz	65
4.3	Ausblick	70
5.	Zusammenfassung	72
6.	Abstract.....	72
7.	Abkürzungsverzeichnis	74
8.	Literaturverzeichnis	76
9.	Kongressbeiträge.....	91
10.	Danksagung.....	92
11.	Lebenslauf	93
12.	Eidesstattliche Erklärung	94

1. Einleitung

1.1 Die Leber in ihrer immunologischen Funktion

Der Leber, dem zentralen Organ des Metabolismus und der Entgiftung, scheint auch im Hinblick auf periphere Immunantworten eine besondere Bedeutung zuzukommen. Die anatomische Lage der Leber an der Schnittstelle von systemischer Blutzirkulation über die *Arteria hepatica* und aufgenommenen Antigenen aus dem Gastrointestinaltrakt über die Portalvene prädestiniert sie für die Regulation von Immuntoleranz und -abwehr. Einerseits kann gegenüber aufgenommenen fremden Antigenen eine adäquate Immunantwort generiert werden, andererseits müssen inadäquate selbstschädigende Entzündungsprozesse vermieden werden, wofür eine Toleranzinduktion in der Leber einen möglichen Mechanismus darstellt (Thomson & Knolle 2010).

Bereits 1969 wurde das tolerogene Potential der Leber erkannt, als Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-inkompatible Lebertransplantate allogener Spender vom Empfängerorganismus toleriert, andere Organe jedoch abgestoßen wurden (Calne, Sells, et al. 1969). Bei Kotransplantation von einer Leber und einem anderen Organ desselben Spenders konnte eine Abstoßung des anderen Organs verhindert werden, sodass ein übertragener tolerogener Effekt der Leber ausgemacht wurde (Calne, White, et al. 1969).

Ähnliches ließ sich auch für den Effekt der oralen Toleranz bestätigen: gegen Antigene, die wiederholt über die Nahrung aufgenommen oder direkt in die Portalvene injiziert wurden, kam es zur Toleranzinduktion (Cantor & Dumont 1967; Weiner 1997); dies galt auch für Autoantigene. Bei Umgehung der Leber durch einen portokavalen Shunt, der das Blut direkt von der Portalvene in die *Vena cava* leitet, ohne die Leber zu passieren bzw. bei anderweitigen chirurgischen Interventionen konnte dieser Effekt hingegen nicht beobachtet werden, was für die essentielle Bedeutung der Leber spricht (Callery et al. 1989; Yang et al. 1994).

Auch die Tatsache, dass pathogene hepatotrope Viren wie Hepatitis B und C (Chisari & Ferrari 1995; Cerny & Chisari 1999) oder Parasiten wie *Shistosoma* (Andrade 2009) häufig trotz einer initialen Immunreaktion persistieren und eine chronische Infektion verursachen, fügt sich in das Bild der tolerogenen Lebereigenschaften. Hier erfolgt eine mangelhafte Pathogenclearance, die vermutlich auf immunsuppressive Mechanismen zurückzuführen ist (Crispe 2014).

Die Beeinflussung anderer Organsysteme durch die systemische Toleranzinduktion der Leber schließt auch das Zentrale Nervensystem (ZNS) ein. Mäuse, die mit dem Autoantigen Myelin Basisches Protein (MBP) immunisiert wurden, um eine Experimentelle Autoimmune Enzephalitis (EAE) – das Mausmodell der humanen Multiplen Sklerose (MS) – zu induzieren, wurden nicht krank, wenn sie das Autoantigen MBP ektopisch in der Leber exprimierten. Eine ektopische Expression in der Haut konnte dagegen nicht vor der autoimmunen Entzündung im ZNS schützen (Lüth et al. 2008).

1.2 Antigenpräsentierende Zellen in der Leber

Die Immunantwort von T-Zellen wird grundsätzlich über eine Interaktion mit Antigenpräsentierenden Zellen (APC) initiiert und moduliert. Den verschiedenen Populationen der leberresidenten nicht-parenchymatösen Zellen (NPC) kommen zentrale Aufgaben bei der Antigenpräsentation zu; als primäre professionelle APC sind hierbei die Dendritischen Zellen

(DC) zu nennen. Die Dendritischen Zellen, welche um die Zentralvenen herum bzw. periportal lokalisiert sind, lassen sich in zwei Hauptpopulationen unterteilen: plasmacytoide (pDC) und „konventionelle“ myeloide DCs (mDC) (F. Li & Tian 2013).

Dendritische Zellen nehmen Antigene in der Peripherie auf, prozessieren sie und präsentieren diese in den drainierenden Lymphknoten den T-Zellen. Die Präsentation des prozessierten Antigens erfolgt über MHC I- und MHC II-Komplexe auf der Zelloberfläche, welche von spezifischen T-Zell-Rezeptoren (TCR) erkannt und gebunden werden. Zusätzlich erfolgt über die Interaktion von CD80 und CD86 auf den DCs mit CD28 auf den T-Zellen eine Kostimulation, die über die Ausschüttung von proinflammatorischen, auto- und parakrin wirkenden Zytokinen wie Interleukin 2 (IL-2) noch vervollständigt wird (Bakdash et al. 2013). Die so aktivierten antigenspezifischen Lymphozyten migrieren zum Ort der Infektion, wo sie ihrer Effektorfunktion nachkommen (Tiegs & Lohse 2010). Auch sinusoidale Endothelzellen der Leber (LSEC), die Kupffer-Zellen (KC) als leberresidente Makrophagen und Ito-Zellen sind in der Lage, Antigene auf ihrer Oberfläche zu präsentieren; im Gegensatz zu DCs wandern sie hierfür jedoch nicht in lymphatische Organe ein, sondern verbleiben als residente Zellen in der Leber (Tiegs & Lohse 2010).

Im spezifischen Umfeld der Leber führt eine Antigenerkennung durch den TCR nicht zwangsläufig zu einer proinflammatorischen Reaktion; im Gegenteil scheint eine antiinflammatorische, tolerogene T-Zell-Antwort über verschiedene Faktoren häufiger begünstigt zu sein (Thomson & Knolle 2010). Hierzu zählen das Zytokinmilieu, das von IL-10, Transforming growth factor β (TGF- β) sowie weiteren antiinflammatorischen Botenstoffen geprägt wird, ebenso wie die Tatsache, dass leberresidente DCs weniger MHC II- und kostimulatorische Moleküle (CD40, CD80, CD86) als nicht-hepatische DCs z.B. aus der Milz exprimieren und so einem unreifen Phänotyp ähneln (Bamboot et al. 2009).

Diese besondere Umgebung in der Leber ermöglicht die Generierung von regulatorischen CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen (Tregs), die über die Regulierung anderer, auch peripherer Zellen das gesamte Immunsystem zu beeinflussen scheinen (F. Li & Tian 2013; Carambia et al. 2014). Insbesondere leberresidente DCs besitzen demnach die Fähigkeit, die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu Tregs zu induzieren (Bamboot et al. 2009).

Weiterhin entfalten DCs der Leber inhibierenden Einfluss auf Effektor-T-Zellen, indem sie diese mittels der negativ kostimulatorischen Oberflächenmoleküle Programmed Cell Death Protein 1 (PD-1) und Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4) hemmen (Bakdash et al. 2013).

Kupfferzellen, hauptsächlich im Lumen der Innenwand der Lebersinusoiden lokalisiert, repräsentieren etwa ein Fünftel der NPCs und stellen damit die größte organständige Makrophagenpopulation dar. KCs zeichnen sich durch die Expression von MHC II, CD80, CD86 und Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) auf der Zelloberfläche aus (F. Li & Tian 2013). Auch exprimieren sie PD-L1, welcher als Ligand von PD-1 auf aktivierten T-Zellen deren Immunantwort inhibiert (Crispe 2014). Der langsame Blutfluss in den Lebersinusoiden erleichtert KCs ihre Aufgabe, Endotoxine, Stoffwechselprodukte und fremde Mikroorganismen aus dem Blutkreislauf zu entfernen. Neben den proinflammatorischen Zytokinen IL-1, IL-6 sowie Tumornekrosefaktor α (TNF- α) zur effizienten Pathogenabwehr produzieren KCs aber auch antiinflammatorisches IL-10, TGF- β und Prostaglandine, womit sie wahrscheinlich an der Aufrechterhaltung der lokalen Toleranz beteiligt sind und eine Gewebeschädigung begrenzen (Thomson & Knolle 2010; Crispe 2014).

Die Aufgabe der sich im Dissé-Raum befindlichen Ito-Zellen bei der Immunregulation liegt sowohl in der Zytokinsekretion zur Rekrutierung von Entzündungszellen als auch in der

Aktivierung von (Natürlichen Killer-) T-Zellen nach Antigenpräsentation. Darüber hinaus wirken sie immunsuppressiv bzw. toleranzfördernd, indem über PD-L1 die T-Zell-Aktivierung begrenzt und zur Expansion von Tregs beitragen wird (Crispe 2014; Dunham et al. 2013). Hepatozyten präsentieren die bei ihren metabolischen Vorgängen entstehenden Neoantigene über MHC-Moleküle den T-Lymphozyten. Eine Aktivierung von CD8+ T-Zellen über MHC I-Komplexe resultiert jedoch nach anfänglicher klonaler Expansion in einer Deletion der CD8+ T-Zellen, wodurch sie insgesamt immunsuppressiv wirkt (Bertolino et al. 1998). Auch die Präsentation von Antigenen über MHC II-Moleküle an CD4+ T-Zellen, was in einer inflammatorischen Umgebung beobachtet werden kann, hat *in vitro* keine proinflammatorischen Folgen (Herkeel et al. 2003).

Unter den nicht-professionellen APCs stellen sinusoidale Endothelzellen der Leber (LSEC) die wahrscheinlich einflussreichste Gruppe dar, die wesentlich zur Toleranzinduktion beizutragen scheint (Crispe 2014). Dank der Expression von MHC I, MHC II und kostimulatorischen Molekülen sind sie in der Lage, mit CD4+ und CD8+ T-Zellen zu interagieren – wobei CD8+ T-Zellen vermehrt funktionell inaktiviert werden und naive CD4+ T-Zellen verstärkt zu antiinflammatorischen T-Zellen differenzieren (Kruse et al. 2009). Der suppressive Effekt von LSECs auf T-Zellen scheint wesentlich von dem Oberflächenmolekül LSECtin abzuhängen (Tang et al. 2009); die Induktion von suppressiven antigenspezifischen Tregs erfolgt unter dem Einfluss des Zytokins TGF- β (Carambia et al. 2014).

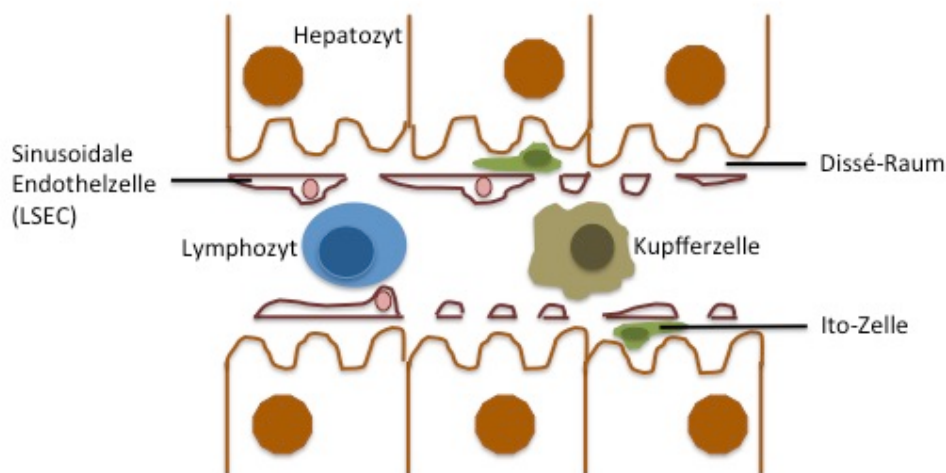


Abb. 1: Schematische Darstellung der an der hepatischen Immunregulation beteiligten Leberzellpopulationen.

1.3 Differenzierung von CD4+ T-Zellen

Ausgehend von naiven CD4+ T-Zellen erfolgt die Differenzierung zu verschiedenen CD4+ Subtypen, nachdem sie durch Interaktion mit APCs aktiviert wurden (Murphy & Reiner 2002). Das aktivierende Signal besteht aus mehreren Faktoren, deren Zusammenspiel zur erfolgreichen Aktivierung notwendig ist: erstens bedarf es der Stimulierung des TCR durch Bindung an MHC II-Komplexe auf APCs, die das passende Antigen präsentieren. Zweitens erfolgt die Kostimulation beispielsweise über eine Interaktion von CD28 mit CD80 und CD86 auf DCs. Dritter Faktor ist die Ausschüttung von Zytokinen, welche auto- und parakrin die weitere Differenzierung beeinflussen (Bakdash et al. 2013).

Anhand der produzierten Zytokine wurde ursprünglich eine Einteilung in nur zwei verschiedene CD4⁺ Untergruppen vorgenommen: T-Helferzellen Typ 1 (Th1) und T-Helferzellen Typ 2 (Th2) (Mosmann et al. 1986). Das Zytokinprofil der Th1-Zellen, die an der zellulären Immunantwort beteiligt sind, wird durch Interferon- γ (IFN- γ), IL-2 und TNF- α charakterisiert (Mosmann & Coffman 1989). In einer von IFN- γ geprägten Umgebung erfolgt die Differenzierung zu Th1-Zellen durch die Transkriptionsfaktoren T-bet und STAT4; zusätzlich wirkt IFN- γ inhibierend auf die Bildung von Th2-Zellen (Murphy & Reiner 2002; Abbas et al. 1996). Für Th2-Zellen und ihre Rolle in der humoralen Immunantwort wurden dagegen IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13 als bestimmende Zytokine beschrieben. IL-4 ist dabei der Faktor, der die Differenzierung zu Th2-Zellen einleitet und die Differenzierung von Th1-Zellen hemmt. Hierbei unterliegt die Th2-Differenzierung den Transkriptionsfaktoren GATA-3 und STAT-6 (Mosmann & Coffman 1989; Abbas et al. 1996; Murphy & Reiner 2002).

Seit der ersten Einteilung in Th1- und Th2-Zellen wurden jedoch weitere Untergruppen von CD4⁺ T-Zellen charakterisiert, denen jeweils spezifische pro-, aber auch antiinflammatorische bzw. regulierende Funktionen zugeordnet werden. Zu nennen sind hier Th17-Zellen, T regulatorische Zellen (Tregs) und Typ 1 regulatorische Zellen (Tr1) (Korn et al. 2007; Thompson & Powrie 2004; Groux et al. 1997).

Th17-Zellen, benannt nach ihrem Leitzytokin IL-17, differenzieren aus naiven CD4⁺ T-Zellen unter dem kombinierten Einfluss des proinflammatorischen IL-6 und des antiinflammatorischen Transforming growth factor β (TGF- β). Des Weiteren spielen die Transkriptionsfaktoren ROR γ t, ROR α und STAT3 eine entscheidende Rolle (Korn et al. 2007; Ivanov et al. 2006; Veldhoen et al. 2006; Bettelli et al. 2006). IL-21, das von den Th17-Zellen selbst produziert wird, vermittelt über autokrine Stimulation eine Zellexpansion; für die Aufrechterhaltung des Th17-Phänotyps ist IL-23 von essentieller Bedeutung (Veldhoen et al. 2006; Korn et al. 2007; Jäger & Kuchroo 2010). Die Funktion der Th17-Zellen scheint in der Abwehr extrazellulärer Pathogene wie beispielsweise *Klebsiella pneumoniae* oder *Borrelia burgdorferi* zu liegen, bei denen die Immunantwort durch Th1- oder Th2-Zellen nicht ausreichend gelingt. Andererseits scheinen Th17-Zellen auch an der Auslösung von Autoimmunerkrankungen beteiligt zu sein (Jäger & Kuchroo 2010; Bettelli et al. 2006). In neueren Studien wird daher das Vorhandensein von Th17-Effektorzellen (Teff17) und Th17-regulatorischen Zellen (Treg17) diskutiert, was die kontroversen Wirkungen erklären könnte. Teff17-Zellen würden sich demnach unter dem Einfluss von IL-6 und IL-23 bilden und sich durch ihre proentzündliche Wirkung auszeichnen. In einer von IL-6 und TGF- β geprägten Zytokinumgebung dagegen differenzierten die naiven CD4⁺ T-Zellen zu Treg17-Zellen, die IL-21 und antientzündliches IL-10 produzieren (Singh et al. 2013; Chaudhry et al. 2009). Unter dem Einfluss von IL-23 können sie sich jedoch anscheinend zu Teff17-Zellen wandeln (Singh et al. 2013). Die Bildung von Th17-Zellen steht im Verhältnis zu Th1- und Th2-Zellen: deren Leitzytokine IFN- γ und IL-4 hemmen die Differenzierung von Th17-Zellen (Jäger & Kuchroo 2010).

Die proinflammatorische Reaktion des Immunsystems auf fremde oder körpereigene Antigene kann von T regulatorischen Zellen moduliert und begrenzt werden, weshalb diese eine wichtige Rolle bei der Induktion und Aufrechterhaltung von Immuntoleranz spielen (F. Li & Tian 2013). Zu diesen regulatorischen T-Zellen gehören CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen (Tregs) sowie Typ 1 regulatorische Zellen (Tr1). Teilweise werden zusätzlich sog. Th3-Zellen beschrieben: Foxp3-negative regulatorische Zellen, die im Zusammenhang mit oraler Toleranzinduktion in Tieren gesehen wurden und antigenspezifisch TGF- β sezernieren. Zumindest ein Teil dieser Th3-Zellen scheint jedoch auch Foxp3⁺ zu sein (S. Sakaguchi et al. 2008).

1.3.1 T regulatorische Zellen

T regulatorische Zellen (Tregs) stellen einen Subtyp der CD4⁺ T-Zellen dar, der die proinflammatorische Wirkung von Effektor-T-Zellen begrenzen kann. Neben der Suppression von differenzierten T-Effektorzellen wird bereits ihre Differenzierung aus naiven T-Zellen sowie deren Proliferation inhibiert (S. Sakaguchi et al. 2008). Erstmals wurden T regulatorische Zellen im Zusammenhang mit der Unterdrückung von Autoimmunität beschrieben (S. Sakaguchi et al. 1985), seitdem sind weitere Erkenntnisse zu ihrer vielfältigen Wirkung auch bei der Transplantattoleranz, chronisch persistierenden Infektionen und im Zusammenhang mit Tumormunität gewonnen worden (H. Y. Wang & R.-F. Wang 2007; S. Sakaguchi et al. 2008).

T regulatorische Zellen lassen sich anhand ihrer Entstehung in zwei Subtypen einteilen: Ein großer Teil entsteht kurz nach der Geburt im Thymus durch MHC II-abhängige T-Zell-Rezeptor-Interaktionen, wobei die Intensität der Interaktion das entscheidende Signal zur Treg-Differenzierung zu sein scheint (Ohkura et al. 2013). Diese CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Zellen werden als natürliche T regulatorische Zellen (nTregs) bezeichnet (S. Sakaguchi 2005). Demgegenüber entsteht ein anderer Teil, sog. induzierte T regulatorische Zellen (iTregs), infolge einer Immunantwort aus konventionellen Foxp3⁻ T-Zellen in der Peripherie (S. Liang et al. 2005; W. Chen et al. 2003). Für diesen Konversionsprozess zu Foxp3⁺ Zellen ist TGF- β das entscheidende Signal; auch *in vitro* können unter seinem Einfluss Tregs induziert werden (W. Chen et al. 2003). In der Leber stellen LSECs mit an ihrer Oberfläche gebundenem TGF- β den potentesten Faktor zur Induktion hepatischer iTregs dar (Carambia et al. 2014).

Gekennzeichnet werden Tregs durch die konstitutive Expression von CD4 sowie CD25, der α -Kette des IL-2-Rezeptors, auf ihrer Zelloberfläche (S. Sakaguchi et al. 1995). Des Weiteren steht mit dem Forkhead box protein 3 (Foxp3) ein Marker zu Verfügung, der spezifisch für murine Tregs ist, und somit eine sichere Identifikation von Tregs erlaubt (Hori et al. 2003). Dieser Transkriptionsfaktor Foxp3 ist essentiell für die Entstehung und Funktionalität der Tregs (Khatti et al. 2003; Fontenot et al. 2003): Defekte im FOXP3-Gen führen zu schwersten, letalen Immunerkrankungen in der Maus bzw. zu dem x-chromosomalen IPEX Syndrom (immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome) im Menschen, einer polyendokrinen Autoimmunkrankheit mit hyperaktiven CD4⁺ T-Zellen, einem Mangel an Tregs und einer Überproduktion von Zytokinen (Wildin et al. 2002; Brunkow et al. 2001).

Bei humanen sowie bei einigen murinen generierten Tregs ist Foxp3 jedoch nur transient vorhanden, da die Transkription einer epigenetischen Regulation unterliegt (Josefowicz & Rudensky 2009). Bei Methylierung des CpG-Locus im foxp3-Gen-Promotor wird die Transkription reduziert. Als Folge wird Foxp3 nicht stabil exprimiert, was insbesondere bei *in vitro* generierten iTregs zur Foxp3-Instabilität führt. Die nTregs zeigen bei vollständiger Demethylierung der CpG-Sequenz dagegen eine stabile Foxp3-Expression (Floess et al. 2007; Polansky et al. 2008; Curotto de Lafaille & Lafaille 2009).

Auch das Zytokin IL-2 ist für die Funktion, Differenzierung und Stabilisierung von Tregs von Bedeutung. So steigert es *in vitro* die suppressive Kapazität von Tregs (Furtado et al. 2002). Mäuse, denen IL-2 oder CD25 fehlen, zeigen eine verringerte Anzahl an Foxp3⁺ Tregs in Verbindung mit der Entwicklung autoimmuner Erkrankungen (Setoguchi et al. 2005; Furtado et al. 2002). Ein ähnliches Bild ergibt sich bei Mäusen, deren T-Zellen nicht mehr über den Transkriptionsfaktor STAT5a und b verfügen; über STAT5a und b erfolgt normalerweise die Signaltransduktion vom IL-2-Rezeptor zum Zellkern, wo über die Bindung an den

foxp3-Promotor die Expression von Foxp3 beeinflusst wird (Burchill et al. 2007). Mit NFAT und Smad3 sind weitere Transkriptionsfaktoren beschrieben, die für die periphere Foxp3-Induktion von Bedeutung sind (Josefowicz & Rudensky 2009).

Auf Zellebene führt Foxp3 zur Inhibierung der inflammatorischen IL-2-, IL-4- und IFN- γ -Produktion bei gleichzeitiger Förderung der Expression Treg-spezifischer Oberflächenproteine wie CD25, Glucocorticoid-inducible tumor necrosis factor receptor (GITR) und Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) (S. Sakaguchi et al. 2008). Insbesondere letztgenanntem Molekül, welches konstitutiv von aktivierten Tregs exprimiert wird, wird eine wichtige Rolle für die zellkontaktabhängige suppressive Funktion der Tregs zugeschrieben (Campbell & Koch 2011), schließlich entwickelten Mäuse mit defektem CTLA-4-Gen innerhalb der ersten Wochen nach Geburt eine letal verlaufende lymphoproliferative Immundysregulation (Waterhouse et al. 1995; Walker 2013). Das Protein CTLA-4 kann mit hoher Affinität an CD80 und CD86 auf der Oberfläche von DCs binden. Zum einen wird dadurch eine Herunterregulation der Expression von CD80 und CD86 initiiert, zum anderen ist diese Bindungsstelle für das konkurrierende CD28 von T-Helferzellen blockiert, diese können so nicht aktiviert werden (Walker 2013; Wing et al. 2011). Auch über eine funktionelle Modulation der APCs sowie die Ausschüttung von Perforinen und Granzymen, welche zytolytisch wirken, vermitteln Tregs ihren suppressiven Effekt auf Entzündungszellen (Gondek et al. 2005; Grossman, Verbsky, Barchet, et al. 2004; S. Sakaguchi 2005). Des Weiteren beeinflussen Tregs das Zytokinmilieu: sie können die Apoptose von T-Effektorzellen induzieren, indem sie für T-Effektorzellen essentielle Zytokine wie z.B. IL-2 binden und entfernen (Pandiyan et al. 2007). Die Sekretion antiinflammatorischer Botenstoffe wie TGF- β , IL-10 und IL-35 durch Tregs, welche hemmend auf proinflammatorische Zellen wirken, sorgt für einen weiteren zellunabhängigen, inhibierenden Effekt (Collison et al. 2007; Shevach 2009).

Trotz ihrer normalerweise geringen Frequenz in der Leber (ca. 1%) (F. Li & Tian 2013) scheinen Tregs für die Aufrechterhaltung von hepatischer Immuntoleranz von großer Relevanz zu sein. Mittels IL-10 bzw. TGF- β konnten sie im Concanavalin-A (ConA)-Hepatitis-Mausmodell auch eine ausgeprägte Leberentzündung eingrenzen (Wei et al. 2008; Erhardt et al. 2007). In einem Mausmodell der Autoimmunhepatitis (AIH), bei dem Ovalbumin in Hepatozyten exprimiert und durch Ovalbumin-spezifische CD8⁺ T-Zellen eine Immunantwort ausgelöst wird, supprimierten CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs selbst eine fulminante Hepatitis (an Haack et al. 2015). Auch hinsichtlich des Schutzes vor Autoimmunität weisen hepatische iTregs ein großes Potential auf: Bei ektopischer Expression des neuronalen Autoantigens Myelin Basisches Protein (MBP) in der Leber wird dort die Bildung peripherer antigenspezifischer CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs induziert. Hierüber wird im Tiermodell der Multiplen Sklerose, dem Mausmodell der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), eine Immuntoleranz gegenüber dem MBP-Antigen und somit Schutz vor der Krankheit vermittelt (Lüth et al. 2008). Die TGF- β -abhängige Konversion konventioneller CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen zu peripheren CD4⁺Foxp3⁺ Tregs erfolgt dabei hauptsächlich durch LSECs mit an ihrer Oberfläche gebundenem TGF- β (Carambia et al. 2014). Dies verdeutlicht die hohe Relevanz von Tregs bei der Kontrolle hepatischer und systemischer Immunantworten.

1.3.2 Typ 1 regulatorische T Zellen

Typ 1 regulatorische Zellen (Tr1) wurden erstmals als CD4⁺ T-Zell-Subtyp beschrieben, der antigenspezifisch T-Effektorzellen supprimieren und so Schutz vor einer Colitis bieten kann (Groux et al. 1997). Als CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen, die ihre suppressive Funktion hauptsächlich über die hohe Sekretion von IL-10 vermitteln, unterscheiden sie sich von den

Foxp3⁺ Tregs und bilden einen eigenen Subtyp regulatorischer T-Zellen (Groux et al. 1997). Eine Identifizierung der Tr1 Zellen wurde anfangs über die Charakterisierung ihres spezifischen Zytokinprofils vorgenommen, bestehend aus hoher IL-10-Sekretion, weiterhin TGF- β -, IFN- γ - und IL-5-Sekretion bei gleichzeitig geringer bzw. nicht vorhandener IL-4- und IL-2-Produktion (Groux et al. 1997; Bacchetta et al. 2002). Auch wenn noch kein spezifisch exprimierter Transkriptionsfaktor von Tr1 Zellen beschrieben ist (H. Zeng et al. 2015), soll eine sichere Identifizierung von Tr1 Zellen anhand ihrer Oberflächenmoleküle CD49b und Lymphocyte activation gene-3 (Lag-3) möglich sein, deren Koexpression für Tr1 Zellen spezifisch sei (Gagliani et al. 2013).

CD49b, ein Rezeptor aus der Integrin-Familie, findet sich auf vielen Zellarten wie beispielsweise Th17- und T-Gedächtniszellen und bindet diverse Moleküle, weshalb es weniger für die Tr1-spezifischen Funktionen verantwortlich zu sein scheint (H. Zeng et al. 2015). Lag-3 ist ein Homolog des CD4-Membranproteins, welches MHC II binden und hierüber die TCR-vermittelte Signaltransduktion in anderen Zellen hemmen kann (Gagliani et al. 2013). Es findet sich ebenfalls auf aktivierten T-Effektorzellen und Foxp3⁺ Tregs (Bruniquel et al. 1998; Camisaschi et al. 2010). Tr1 Zellen weisen eine Vielzahl weiterer Membranproteine wie CD40L, CTLA-4, Programmed cell deathprotein 1 (PD-1) und inducible co-stimulator (ICOS) auf, die für die Funktion wichtig, jedoch nicht spezifisch sind (H. Zeng et al. 2015).

Bei der Differenzierung des Tr1-Phänotyps, wofür IL-10 entscheidend ist, spielen verschiedene Transkriptionsfaktoren eine Rolle; zu nennen sind hier primär das Homolog des Protoonkogens Avian Musculoaponeurotic Fibrosarcoma (c-Maf), der Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR), Interferonregulierender Faktor 4 (IRF4) und das Early growth response protein 2 (Egr-2) (H. Zeng et al. 2015; Jin et al. 2013). Die Expression von c-Maf wird durch IL-2 und IL-6 induziert, welche über STAT3 und STAT5 an die Promotorregionen des IL-10- und c-Maf-Gens binden, sodass eine optimale Aktivierung erfolgen kann (Jin et al. 2013; Tsuji-Takayama et al. 2008; Rani et al. 2011; Benkhart et al. 2000; Stumhofer et al. 2007). Dabei scheint ein Zusammenwirken mit Ahr zu erfolgen: durch IL-27 induziert, bindet Ahr an c-Maf, worüber in der Folge die Genpromotoren von IL-10 und IL-21 aktiviert werden, welche für die Differenzierung eines Tr1-Phänotyps wichtig sind (Apetoh et al. 2010).

Von Relevanz für die IL-10-Produktion und somit Tr1-Differenzierung ist auch Egr-2. Werden naive CD4⁺ T-Zellen mit IL-27 stimuliert, erfolgt eine Phosphorylierung von Stat3 und die Aktivierung des Egr2-Signalweges (Vasanthakumar & Kallies 2013), welcher die Expression des Gens PR domain zinc finger protein 1 (Prdm1) und des zugehörigen Proteins B lymphocyte-induced maturation protein-1 (Blimp-1) stimuliert. Der Egr-2-Signalweg scheint also notwendig für die Blimp-1-vermittelte IL-10-Produktion (Iwasaki et al. 2013) und korrespondiert mit der Lag-3-Expression auf IL-10-produzierenden suppressiven CD4⁺ T-Zellen (Okamura et al. 2012).

Die immunmodulatorische Funktion von Tr1 Zellen, nachdem sie über ihren T-Zell-Rezeptor antigenspezifisch aktiviert wurden, entfaltet sich vor allem über die Wirkung von IL-10 und TGF- β (Roncarolo et al. 2014; Groux et al. 1997). Die Suppression von T-Effektorzellen bzw. die Inhibierung unerwünschter Immunantworten erfolgt eher in der lokalen Umgebung, im Gegensatz zu nTregs, die auch systemische Wirkung aufweisen (H. Zeng et al. 2015). Es werden vier verschiedene Mechanismen der Suppression beschrieben: Zum einen führt die Sekretion von IL-10 zur Hemmung von T-Effektorzellen und APCs. IL-10 und TGF- β unterdrücken die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-2 und IFN- γ , wodurch Proliferation und Funktion der T-Zellen unterdrückt werden (Vieira et al. 2004; Gorelik & Flavell 2002; Groux et al. 1997). Auf APCs entfaltet IL-10 seine Wirkung, indem es immunmodulatorische Membranproteine wie Immunoglobulin-like transcript-3 (ILT3) und -4 (ILT4)

hochreguliert, was in der Folge die Reifung der APCs verhindert und so zu T-Zell-Toleranz führt (Manavalan et al. 2003; Gregori et al. 2010). Zweitens können Tr1 Zellen über die Ausschüttung von Granzym B und Perforin eine Zytolyse von Dendritischen Zellen vermitteln (Grossman, Verbsky, Tollefsen, et al. 2004; Roncarolo et al. 2014). Drittens ist ein Einfluss von Tr1 Zellen auf T-Effektorzellen in der Umgebung von Tumoren beschrieben worden, indem sie Ektoenzyme wie CD39 und CD73 induzieren, was die metabolische Regulation der T-Effektorzellen stört und somit suppressiv wirkt (Mandapathil et al. 2010; H. Zeng et al. 2015). Viertens können Tr1 Zellen ihre Wirkung entfalten, indem sie über kostimulatorische bzw. koinhibitorische Oberflächenmoleküle die Funktion von DCs und darüber auch T-Effektorzellen beeinflussen, ähnlich den Tregs (Gregori et al. 2012). Von Bedeutung sind dabei beispielsweise CTLA-4 und PD-1. CTLA-4 bindet an CD80 und CD86 auf DCs, wodurch APCs und folglich T-Effektorzellen gehemmt werden – hierbei handelt es sich um die gleichen Mechanismen wie bei den Tregs (Wing et al. 2011; Akdis et al. 2004). Synergistisch dazu wirkt der PD-1-Signalweg, bei dem PD-1 auf Tr1 Zellen über Bindung an seine Liganden PD-L1 oder PD-L2 eine antigenspezifische Inhibierung der T-Effektorzellen auslöst. In Versuchen hob eine Blockierung von PD-1 die Tr1-vermittelte Hemmung antigenspezifischer T-Effektorzellen teilweise auf, sodass PD-1 von Bedeutung für die Wirkung von Tr1 Zellen zu sein scheint (Fife & Pauken 2011; Gregori et al. 2012; Akdis et al. 2004).

Der immunsuppressive Einfluss von Tr1 Zellen zeigt sich in Zusammenhang mit der Vermittlung von Toleranz nach Organtransplantation, bei der Persistenz chronischer Entzündungen, Tumormunität sowie bei verschiedenen Autoimmunkrankheiten (Roncarolo et al. 2014). Zu letzteren zählen u.a. chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED), bei welchen der Transfer von antigenspezifischen Tr1 Zellen eine weitere Inflammation im Mausmodell unterdrückte (Groux et al. 1997). Auch im Mausmodell der Multiplen Sklerose konnte durch den Transfer von Tr1 Zellen die Ausbildung von Symptomen einer Neuroinflammation unterbunden werden (Barrat et al. 2002). Für Diabetes Mellitus Typ 1, Pemphigus Vulgaris, Myasthenia Gravis und Zöliakie existieren ebenfalls Daten, die die Relevanz von Tr1 Zellen im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen unterstreichen (H. Zeng et al. 2015; Roncarolo et al. 2014). Inzwischen existieren erste klinische Studien, in denen Tr1 Zellen als Therapieoption bei hämatologischen Malignomen bzw. CED untersucht werden. Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass es sich um ein sicheres Verfahren handeln könnte (Bacchetta et al. 2014).

1.4 TGF- β und IL-10 als antientzündliche Zytokine in der Leber

Zur Gewährleistung der Immunhomöostase kommt proinflammatorischen und immunmodulierenden Zytokinen eine besondere Rolle zu. Sowohl im Zusammenhang mit Infektionen als auch mit Autoimmunität beeinflussen sie die Differenzierung und Effektorfunktion von Lymphozyten (Sanjabi et al. 2009), wobei sie zell- und kontextabhängig pleiotrope Effekte im Immunsystem haben können (M. O. Li & Flavell 2008b). Für das tolerogene Umfeld der Leber sind vor allem die regulatorischen Zytokine TGF- β und IL-10 bedeutsam, welche dort nicht nur von Tregs und Tr1 Zellen, sondern auch von nicht-parenchymatösen Zellen in der Leber, beispielsweise LSECs, produziert werden (Thomson & Knolle 2010; Crispe 2011; M. O. Li & Flavell 2008b).

Das Zytokin Transforming growth factor β (TGF- β) findet sich in drei Isoformen in Säugetieren (TGF- β 1, -2, -3), wobei TGF- β 1 den größten modulatorischen Einfluss auf das Immunsystem hat (M. O. Li, Wan, et al. 2006). Dies wurde erstmals deutlich, als TGF- β 1-defiziente Mäuse spontan eine multifokale inflammatorische Autoimmunkrankheit entwi-

ckelten (Kulkarni et al. 1993; Shull et al. 1992). Einen ähnlichen Phänotyp, mit Hyperproliferation und Aktivierung von T-Effektorzellen, zeigen Mäuse, deren gesamtes T-Zell-Repertoire einen dominant-negativen TGF- β -Rezeptor exprimiert (M. O. Li, Sanjabi, et al. 2006; Shull et al. 1992; Marie et al. 2006). TGF- β entfaltet eine hemmende Wirkung auf die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu Th1- oder Th2-Zellen, wohingegen es die Differenzierung von iTregs induziert (M. O. Li & Flavell 2008a). Bereits im Thymus ist TGF- β für die Entwicklung der T-Zellen sowie nTregs relevant, wobei die exakten Zeitpunkte und Mechanismen der Wirkung dabei noch umstritten sind (Y. Liu et al. 2008; M. O. Li & Flavell 2008b). Neben der eingeschränkten Treg-Generierung wirkt sich eine Störung des TGF- β -Signalweges negativ auf die Kontrolle von aktivierten T-Effektorzellen aus, welche in diesem Fall nicht durch Tregs supprimiert werden können (M. O. Li & Flavell 2008a; Fahlén et al. 2005).

TGF- β wird als unreife Vorstufe, sog. pro-TGF- β , synthetisiert, welches als Propeptid einen aminoterminalen Schwanz und ein Signalpeptid enthält (Derynck et al. 1985). Hierüber gelangt es zum Golgi-Apparat, wo es durch Furin-Peptidasen prozessiert und dabei der Aminoterminal abgeschnitten wird (Dubois et al. 1995). Aus den aminoterminalen Peptiden entsteht das Latency-associated peptide (LAP), welches als Homodimer nicht-kovalent an das Homodimer eines reifen TGF- β bindet und so latentes TGF- β bildet (Saharinen et al. 1996; Gleizes et al. 1996). Dieser Komplex wird dann entweder sezerniert oder assoziiert an Latent TGF- β binding protein (LTBP), worüber eine Adressierung an die Extrazelluläre Matrix erfolgt (Saharinen & Keski-Oja 2000; Annes et al. 2003). Im latenten Zustand ist die Bindung von TGF- β an seine Rezeptoren in der Regel nicht möglich. Erst durch die Proteolyse von LAP durch TGF- β -Aktivatoren oder durch eine Konformationsänderung des Komplexes geht TGF- β in seine aktive Form über (Kulkarni et al. 1993; Annes et al. 2003; M. O. Li & Flavell 2008b).

Jedoch kann eine Bindung von latentem TGF- β an Glycoprotein A repetitions predominant (GARP), wie es speziell von aktivierten Tregs exprimiert wird, erfolgen (A. X. Zhou et al. 2013). Auch LSECs sind über GARP/LAP/TGF- β in der Lage, antigenspezifische Tregs zu induzieren (Carambia et al. 2014). Diese so aktivierten Tregs sind potente Induktoren von Th17-Zellen in Gegenwart von IL-6 bzw. von weiteren Tregs bei IL-2-Präsenz (J. P. Edwards et al. 2013). Die *de novo* Generierung von Foxp3⁺ Tregs durch TGF- β und IL-2 ist konzentrationsabhängig: bei viel TGF- β werden bevorzugt Tregs gebildet, bei wenig TGF- β läuft die Differenzierung zu Th17-Zellen verstärkt ab (Andersson et al. 2008; S. G. Zheng et al. 2007; Korn et al. 2009; L. Zhou et al. 2008). Eine Hemmung der T-Zell-Antwort erfolgt des Weiteren durch Itozellen mittels aktivem TGF- β aus membrangebundenem latenten GARP/TGF- β -Komplex (Y. Li et al. 2015).

Bei Bindung von TGF- β an die Zelle werden die TGF- β -Rezeptoren Typ I und Typ II zusammen gebracht, transmembranäre Serin-Threonin-Kinasen (Shi & Massagué 2003; M. O. Li & Flavell 2008b). Das weitere Signaling erfolgt über verschiedene Phosphorylierungsschritte von Smad-Proteinen als Transkriptionsfaktoren sowie über Smad-unabhängige Signalwege wie Mitogen-activated protein kinases (MAPK), Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) oder die Proteinphosphatase 2A (PP2A), über welche die pleiotropen Effekte von TGF- β im Immunsystem vermittelt werden (M. O. Li & Flavell 2008a; Shi & Massagué 2003; Massagué & Gomis 2006).

Auch das Zytokin IL-10 entfaltet pleiotrope, von den Zielzellen abhängige Effekte auf das Immunsystem (Mosser & X. Zhang 2008). Es wurde ursprünglich als von Th2-Zellen produziertes, Th1-Zellen hemmendes Zytokin beschrieben (Fiorentino et al. 1989), tatsächlich wird es von diversen T-Zellen produziert. Insbesondere Th2-, Treg-, Tr1- und Th17-Zellen,

aber auch Zytotoxische T-Zellen und Th1-Zellen sezernieren IL-10. In geringerem Maße sind dazu ebenso B-Zellen, NK-T-Zellen, Makrophagen und APCs als Antwort auf eine Pathogeninfektion in der Lage (Moore et al. 2001; Sanjabi et al. 2009).

Die Bedeutung des Zytokins wurde evident, als IL-10-defiziente Mäuse in spezifisch-pathogen-freier Umgebung eine letale Colitis entwickelten (Kühn et al. 1993). Auch in keimfreier Umgebung zeigen diese Tiere eine erhöhte Suszeptibilität für eine Colitis; zusammengekommen verdeutlicht dies die Relevanz von IL-10 für den Erhalt der T-Zell-Toleranz gegenüber Antigenen der kommensalen Darmflora bzw. Limitierung von Inflammation und Gewebeschaden im Gastrointestinaltrakt (Sellon et al. 1998; M. O. Li & Flavell 2008a; Rakoff-Nahoum et al. 2006). Da jedoch ein hoher IL-10-Spiegel die Persistenz chronischer Infektionen fördert und die Pathogenclearance vermindert, ist eine feine Abstimmung der IL-10-Regulation essentiell für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase (Couper et al. 2008).

Das Homodimer IL-10 vermittelt seine Wirkung über die IL-10-Rezeptoren Typ 1 (IL-10R1) und Typ 2 (IL-10R2). IL-10 bindet an einen heteromeren Komplex aus je zwei der Rezeptortypen, woraufhin der Transkriptionsfaktor Stat3, der weiteren regulatorischen Einflüssen unterliegt, aktiviert wird (Mosser & X. Zhang 2008; O'Shea & Murray 2008). Andere, nicht Stat3-abhängige Signalwege sind beispielsweise die PI3K- und NF κ B-Signalwege, weitere werden diskutiert (Mosser & X. Zhang 2008).

Die exakten Mechanismen der IL-10-Expression in T-Zellen sind noch nicht vollständig geklärt; mithilfe der Generierung von IL-10-Reportermäusen, bei denen IL-10-produzierende Zellen eine Green Fluorescent Protein (GFP)-Autofluoreszenz aufweisen, lassen sich jedoch neue Erkenntnisse gewinnen (Kamanaka et al. 2006). So konnte gezeigt werden, dass IL-10-produzierende Zellen nicht im Thymus, aber in peripheren Geweben in verschiedener Häufigkeit zu finden sind, mit dem größten Anteil im Gastrointestinaltrakt (Kamanaka et al. 2006; Maynard et al. 2007).

IL-10 reguliert die T-Zell-Antwort sowohl direkt als auch indirekt über die Beeinflussung von APCs. Letzteres geschieht durch die Unterdrückung der Produktion inflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-12 und TNF- α sowie durch verminderte Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD80 und CD86 auf Dendritischen Zellen (M. O. Li & Flavell 2008a; Moore et al. 2001). Der direkte Einfluss von IL-10 zeigt sich zum einen in der Autoregulation von Th1-Zellen, deren selbst produziertes IL-10 eine überschießende Th1-Antwort während Infektionen begrenzt (Jankovic et al. 2007). Des Weiteren fördert es die Differenzierung von IL-10-produzierenden Tr1 Zellen, wobei IL-27 und TGF- β wichtige Kofaktoren sind (Groux et al. 1997; Stumhofer et al. 2007; M. O. Li & Flavell 2008a). Eine weitere Schnittstelle mit TGF- β ergibt sich aus der Beobachtung, dass eine Treg-spezifische IL-10-Gen-Deletion zur Entwicklung einer Colitis bei Mäusen führt (Rubtsov et al. 2008). Das von Tregs produzierte IL-10 ist demnach wichtig für die Aufrechterhaltung der Toleranz – für die Induktion und Funktion von Tregs wiederum ist TGF- β unabdingbar, sodass das Zusammenspiel von IL-10 und TGF- β für die Immunhomöostase von zentraler Bedeutung ist (Maynard et al. 2007).

Auch in der Leber, im ConA-Hepatitis-Mausmodell, konnte der protektive Effekt von IL-10 beobachtet werden. Die exogene Zufuhr von IL-10 schützte vor ConA-induzierten Leberschäden, welche umso gravierender ausfielen, wenn IL-10 durch Antikörper blockiert oder bei IL-10-knockout Mäusen nicht wirksam werden konnte (Di Marco et al. 1999). Dabei scheinen hauptsächlich T regulatorische Zellen und Kupffer-Zellen für die IL-10-Produktion verantwortlich zu sein, was mit der Induktion einer Toleranz im ConA-Modell einherging.

Bei IL-10-Blockade durch Antikörper wurde diese wieder durchbrochen bzw. in IL-10-defizienten Mäusen konnte sie erst gar nicht induziert werden (Erhardt et al. 2007; Erhardt & Tiegs 2010).

1.5 Die koinhibitorischen Zellmembranproteine CTLA-4 und PD-1

Bei dem Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) handelt es sich als Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie um ein Homolog zu CD28 mit einer stärkeren Bindungsaffinität zu CD80 und CD86 (Buchbinder & Desai 2016; Dariavach et al. 1988). Es liegt als Homodimer vor, besteht aus einer extrazellulären und einer zytoplasmatischen Domäne und findet sich in ruhenden Lymphozyten größtenteils in intrazellulären Vesikeln (Walker & Sansom 2015; Alegre et al. 1996). Nach Aktivierung der T-Zellen durch TCR-Bindung und CD28-Kostimulation wird CTLA-4 durch Exozytose in die Zellmembran integriert; je stärker hierbei das TCR-Signal der Aktivierung, desto mehr CTLA-4 wird auf der Zelloberfläche exprimiert (Linsley et al. 1996). Tregs scheinen CTLA-4 konstitutiv zu exprimieren, jedoch ist auch hier die Quantität vom Grad der Aktivierung abhängig (Buchbinder & Desai 2016).

Ist der genaue Mechanismus der Hemmung auch kontrovers, so wird eine Schlüsselrolle, die CTLA-4 bei der Kontrolle von autoreaktiven T-Zellen zukommt, anerkannt und konnte in Studien gezeigt werden (Takahashi et al. 2000; Read et al. 2000). Eine Defizienz von CTLA-4 provoziert ein lymphoproliferatives Krankheitsbild, das dem IPEX-Syndrom bei Foxp3-Defizienz ähnelt (Wing et al. 2011). Die suppressive Wirkung des CTLA-4 wird größtenteils über Dendritische Zellen vermittelt (Cobbold et al. 2010): durch die hochaffine Bindung an CD80 und CD86 antagonisiert es den kostimulatorischen Rezeptor CD28 auf T-Zellen (Buchbinder & Desai 2016). Das Verhältnis der CD80/86-Bindungsstellen, die durch stimulierendes CD28 oder durch inhibierendes CTLA-4 besetzt sind, definiert damit, ob die T-Zelle aktiviert oder anergisch wird (Krummel & Allison 1995). Des Weiteren führt CTLA-4 zu einer Herunterregulierung der Expression von CD80 und CD86 auf DCs; nach der Transendozytose werden diese Moleküle lysosomal abgebaut (Oderup et al. 2006; Qureshi et al. 2011).

Für die suppressive Wirkung des CTLA-4 scheint dessen extrazelluläre Domäne ausreichend zu sein; Mäuse, bei denen der zytoplasmatische Anteil des CTLA-4 fehlte, zeigten trotzdem eine suffiziente Hemmung der T-Zell-Antwort (Masteller et al. 2000; Tai et al. 2012). Interessanterweise kann CTLA-4 auch bei Abwesenheit von Foxp3 auf Tregs eine ausreichende Inhibition vermitteln (Y. Zheng et al. 2008; Gao et al. 2011).

Auch das Programmed cell death protein 1 (PD-1) ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie bzw. CD28-Familie der kostimulatorischen Rezeptoren (Buchbinder & Desai 2016). Als Transmembranprotein, kodiert durch das Pdcd-1-Gen, weist es eine extrazelluläre und eine zytoplasmatische Domäne auf und liegt als Monomer vor (Keir et al. 2008). Ursprünglich wurde PD-1 im Zusammenhang mit dem programmierten Zelltod bei T-Zell-Hybridomen beschrieben, jedoch scheint inzwischen evident, dass es auf die zelluläre Aktivierung Einfluss nimmt statt auf den programmierten Zelltod (Ishida et al. 1992; S. C. Liang et al. 2003). Exprimiert wird PD-1 auf aktivierten T-Zellen, NK-T-Zellen, B-Zellen und myeloiden Zellen, nicht jedoch auf ruhenden Zellen (Keir et al. 2008), womit es eine weitere Verbreitung aufweist als CTLA-4. PD-1 gilt des Weiteren als Marker für „ausgebrannte“ (engl.: exhausted) T-Zellen, die einer starken bzw. andauernden Stimulation unterlagen, was zu einer T-Zell-Dysfunktion führt wie sie bei chronischen Infektionen oder Tumoren beobachtet werden kann (Wherry & Kurachi 2015).

Nach Bindung von PD-1 an einen seiner Liganden PD-L1 oder PD-L2 wird eine Inhibition der T-Zell-Proliferation sowie der Produktion der proinflammatorischen Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-2 ausgelöst, einhergehend mit einer gesteigerten T-Zell-Apoptose (Fife & Pauken 2011). Dies geschieht jedoch ausschließlich bei koinzidenteller Bindung von TCR und PD-1 durch dieselbe APC, weshalb die räumliche Nähe zwischen T-Zell-Rezeptor und PD-1 von entscheidender Bedeutung für die Inhibition ist (Keir et al. 2008). Wird PD-1 also adäquat aktiviert, erfolgt die intrazelluläre Phosphorylierung zweier Tyrosine der zytoplasmatischen Domäne. Hieran können in der Folge die Protein-Tyrosin-Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 binden, welche über eine Dephosphorylierung weiterer Moleküle des Signalweges, wie z.B. PI3K und PKB, eine Beendigung der T-Zell-Aktivierung oder Störung des T-Zell-Stoffwechsels vermitteln (Francisco et al. 2010; Bennett et al. 2003). SHP-1 und -2 interagieren dafür mit dem Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) und dem Immunoreceptor tyrosine-based switch motif (ITSM) des zytoplasmatischen Schwanzes von PD-1 (Chemnitz et al. 2004; Fife & Bluestone 2008; Okazaki et al. 2001).

Des Weiteren kann über PD-1 eine Hemmung der Expression von Transkriptionsfaktoren wie GATA-3 und Tbet erfolgen, was ebenso wie die Inhibition der PI3K- und PKB-Aktivierung die T-Zell-Funktion negativ reguliert (Chemnitz et al. 2004; Parry et al. 2005; Dong & Nurieva 2003; Fife & Bluestone 2008). Durch die verminderte Induktion des antiapoptotischen Proteins Bcl-xL, eine weitere Funktion von PD-1, wird das T-Zell-Überleben reduziert (Chemnitz et al. 2004). Bei rechtzeitiger Aktivierung von CD28 können jedoch die inhibitorischen Wirkungen durch PD-1 aufgehoben werden (Keir et al. 2008).

Die Vielzahl der biologischen Effekte von PD-1 erklärt sich auch durch die verschiedenen Liganden und deren weiter Verbreitung auf diversen Zellarten. PD-L1 findet sich auf Leukozyten, nicht-hämatopoetischen Zellen, Dendritischen Zellen, in nicht-lymphatischem Gewebe, aber auch auf Parenchymzellen nach IFN- γ -Aktivierung sowie auf Tumorzellen und Tumor-infiltrierenden Lymphozyten. Typ 1- und Typ 2-Interferone sowie TNF- α induzieren die Expression von PD-L1 (Francisco et al. 2009). Das Vorkommen des höher affinen PD-L2 ist auf aktivierten Dendritischen Zellen und Monozyten beschrieben worden, insbesondere nach Stimulation durch Interferone, IL-4 oder Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (Youngnak et al. 2003; Buchbinder & Desai 2016; Fife & Pauken 2011).

Dass PD-1 von Bedeutung für T-Zell-Toleranz bzw. Autoimmunität sein könnte, wurde erstmals bei PD-1-defizienten Mäusen beschrieben, die spontan nach einigen Wochen eine dem Lupus erythematoses ähnliche Autoimmunkrankheit entwickelten (Nishimura et al. 1999).

Neben der zentralen Toleranz ist PD-1 insbesondere für die periphere Toleranz relevant: es limitiert die initiale Phase der Aktivierung und Expansion sowie die Funktionen von autoreaktiven T-Effektorzellen bzw. die Differenzierung von naiven T-Zellen zu T-Effektorzellen (Zucchelli et al. 2005; Ansari et al. 2003; Keir et al. 2006). Die Schäden an Zielorganen der autoreaktiven Zellen werden begrenzt (Zucchelli et al. 2005). Dementsprechend konnte für verschiedene Autoimmunkrankheiten wie Diabetes Mellitus Typ 1, Rheumatoide Arthritis, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen und Multiple Sklerose eine protektive Wirkung der PD-1/PD-L1-Achse gesehen werden (Francisco et al. 2010).

Für die Gewebetoleranz scheint die Expression von PD-L1 auf nicht-hämatopoetischen Zellen von Bedeutung zu sein: PD-L1 auf Endothelzellen beispielsweise kann die Migration von autoreaktiven T-Zellen aus dem Blutgefäß ins Zielorgan beschränken und so zur Toleranz beitragen (Rodig et al. 2003; Gräbe et al. 2007). Die PD-1/PD-L1-Achse fördert des

Weiteren die Differenzierung und das Überleben von Tregs, indem der Signalweg über PI3K, PKB und Mammalian target of rapamycin (mTor) blockiert und die Expression des Proteins Phosphatase and tensin homolog (PTEN) verstärkt wird. Beide Mechanismen begünstigen das Zellüberleben von Tregs (Sauer et al. 2008; Francisco et al. 2009).

Die inhibitorischen Oberflächenmoleküle CTLA-4 und PD-1 zeigen also einige Gemeinsamkeiten: beide sind Mitglieder der CD28-Proteinfamilie, werden von aktivierten T-Zellen exprimiert und beeinflussen z.T. die gleichen Signalmoleküle wie PI3K und PKB. Hierüber bewirken sie die Reduktion von T-Zell-Aktivierung und -Überleben sowie Zytokinproduktion, was insgesamt toleranzfördernd wirkt. Unterschiede ergeben sich hinsichtlich der Verbreitung im Organismus: PD-1 und seine Liganden werden nicht nur von aktivierten T-Zellen exprimiert, sondern auch von verschiedenen weiteren Zellarten, im Gegensatz zu den streng auf T-Zellen limitierten CTLA-4 und seinen Liganden auf professionellen APCs (Buchbinder & Desai 2016). PD-1 wirkt daher besonders in peripheren, CTLA-4 in lymphatischen Geweben. Zeitlich betrachtet erfolgt die Hemmung der T-Zell-Aktivierung durch CTLA-4 früher als durch PD-1, welches dann aktivierte Effektorzellen hemmt. PD-1 scheint dafür mit einer größeren Zahl von T-Zell-Signalwegen zu interferieren als CTLA-4 (Fife & Pauken 2011).

1.6 Multiple Sklerose und das Tiermodell der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis

Bei der Multiplen Sklerose (MS) handelt es sich um eine humane, chronische, demyelinisierende Erkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS), die mit einer CD4⁺ T-Zell-vermittelten Inflammation und einem Verlust der Axone einhergeht (Compston & Coles 2008). Die Krankheit wird durch das Auftreten neurologischer Defizite wie somatosensorischer, pyramidal-motorischer und visueller Ausfälle bzw. Störungen gekennzeichnet (Constantinescu et al. 2011). Es existieren unterschiedliche klinische Verlaufsformen, anhand derer die Krankheit in verschiedene Typen eingeteilt werden kann (Lublin & Reingold 1996). Die MS ist eine immunvermittelte Krankheit, deren Eigenschaften einen autoimmunen Prozess früh vermuten ließen, wie z.B. die Assoziation zu anderen Autoimmunkrankheiten, das Ansprechen auf immunsuppressive und -modulierende Therapien und genetische Risiko-Loci in MHC- und anderen für die Immunantwort wichtigen DNA-Abschnitten (L. J. Edwards & Constantinescu 2004; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC) 2008; Constantinescu et al. 2011). Als Ziele der autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen wurden Proteine identifiziert, die von Myelin-produzierenden Oligodendrozyten exprimiert werden bzw. in der Myelinscheide vorkommen wie Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) und Myelin Basisches Protein (MBP) (Robinson et al. 2014).

Für die Pathogenese der MS schienen lange Zeit hauptsächlich aktivierte, IFN- γ -produzierende Th1-Zellen verantwortlich zu sein (Zamvil et al. 1985; Sriram et al. 1982), inzwischen wurde jedoch die Bedeutung von Th17-Zellen, die durch IL-23 stimuliert werden und die Zytokine IL-17, IL-22 und IL-21 produzieren, evident (Cua et al. 2003; Becher et al. 2003; Langrish et al. 2005; McFarland & Martin 2007). Nach allgemeiner pathogenetischer Vorstellung werden die T-Zellen durch DCs in der Peripherie auf ein Myelin-Autoantigen gepriimt, gelangen über die Blut-Hirn-Schranke ins ZNS, wo sie von den dort residenten APCs aktiviert werden. Die ausgeschütteten Zytokine schädigen die Myelinschicht und die Axone, aktivieren Mikroglia und ziehen weitere Entzündungszellen ins ZNS, was eine Entzündungskaskade auslöst (Constantinescu et al. 2011). Nach einem Schub tritt häufig eine partielle Besserung ein, die auf den antiinflammatorischen Einfluss von Tregs und Zytokinen wie IL-10 zurückzuführen sein soll (Constantinescu et al. 2011).

Zur genaueren Untersuchung und zum besseren Verständnis der Krankheit wurde recht früh das Tiermodell der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) entwickelt (Rivers & Schwentker 1935; Olitsky & Yager 1949). Da im EAE-Modell die Entzündungskaskade mit immun- und neuropathologischen Vorgängen weitgehend ebenso abläuft wie in der MS, hat es sich zum am weitesten verbreiteten Tiermodell der MS entwickelt; es eignet sich aber auch generell für die Untersuchung von zellvermittelten organspezifischen Immunantworten, immunologischer Toleranz und T regulatorischen Zellen (Constantinescu et al. 2011).

Ein wichtiger Unterschied besteht darin, dass sich die EAE erst nach externer Immunisierung entwickelt im Gegensatz zum spontanen Auftreten der MS. Die Immunisierung erfolgt gegen ein Myelin-Antigen, typischerweise Proteolipidprotein (PLP), MBP oder MOG bzw. Peptidteile davon, die in einer Wasser-in-Öl-Emulsion mit einem Adjuvans appliziert werden (Robinson et al. 2014). Typischerweise wird dabei Komplettes Freundesches Adjuvans verwendet, welches hitzeinaktiviertes *Mycobacterium tuberculosis* enthält, um eine starke Immunreaktion zu provozieren (Robinson et al. 2014). Nach der Aktivierung autoreaktiver T-Zellen durch periphere Immunisierung wandern und sammeln sich die autoreaktiven T-Zellen in der Milz, von wo aus sie ins ZNS migrieren. Dort im Zielgewebe werden sie durch Antigenpräsentation auf lokalen APCs aktiviert und lösen den Entzündungsprozess aus (Hart et al. 2009).

Die EAE-Krankheitssymptome der Mäuse beginnen typischerweise zwischen Tag 9 und 15 nach Immunisierung, es entwickelt sich eine aufsteigende schlaffe Lähmung vom Schwanz bis zu den Vorderläufen, die von einem Gewichtsverlust begleitet wird (Robinson et al. 2014). Es besteht eine große Heterogenität des EAE-Verlaufes in Bezug auf die Suszeptibilität der Mausstämmen und der gewählten Methode der Induktion (Constantinescu et al. 2011). Bei Immunisierung mit dem Autoantigen MBP ist der Krankheitsverlauf in der Regel durch eine schwere Entzündungsreaktion im ZNS mit vergleichsweise geringer Demyelinisierung gekennzeichnet, was beispielsweise die Untersuchung akuter Inflammation begünstigt (Meeson et al. 1994). Mäuse der Stämme SJL mit dem MHC-Haplotyp H-2^s sowie B10.PL mit dem Haplotyp H-2^u zeigen sich suszeptibel für eine EAE-Induktion mittels MBP. Im B10.PL-Hintergrund findet sich als immundominantes enzephalitogenes T-Zell-Epitop des MHC II-Komplexes das aminoterminal acetylierte Peptid Ac1-9 des MBP (Zamvil et al. 1986; Fairchild et al. 1993).

1.6.1 Hepatisch induzierte Toleranz im EAE-Modell

T regulatorischen Zellen kommt auch im Rahmen der EAE eine wichtige modulatorische Funktion zu. CD4⁺CD25⁺ Tregs inhibieren *in vitro* die Proliferation und IFN- γ -Produktion von Myelin-spezifischen Th1-Zellen; ein adoptiver Transfer dieser Zellen führte *in vivo* zu einer deutlich abgeschwächten EAE-Symptomatik in den Empfängern (Kohm et al. 2002). Mäuse der Linie tg4, die obligat einen für das MBP-Peptid Ac1-9 spezifischen, transgenen T-Zell-Rezeptor exprimieren, sind suszeptibel für eine EAE-Induktion mittels MBP-Immunisierung (G. Y. Liu et al. 1995). Ein adoptiver Transfer von CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs aus diesen Tieren schützte die Empfänger vor einer EAE bzw. verbesserte die Erholung bereits erkrankter Tiere – bei polyklonalen, unspezifischen Tregs fand sich diese Wirkung nicht, was die Relevanz der Antigenpezifität herausstellt (Stephens et al. 2009). Auch für induzierte antigenspezifische CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs konnte ein schützender Effekt gezeigt werden (H. Zhang et al. 2010).

In Mäusen, die MBP ektopisch in der Leber exprimieren, werden aus konventionellen CD4+CD25- T-Zellen MBP-spezifische CD4+CD25+Foxp3+ Tregs generiert; LSECs mit membrangebundenem TGF- β sind dabei die potentesten Induktoren (Carambia et al. 2014). Die iTregs unterdrücken *in vitro* die Proliferation und Zytokinproduktion von T-Effektorzellen bzw. vermitteln *in vivo* einen Schutz vor EAE (Lüth et al. 2008). Hierbei handelt es sich um einen leberspezifischen Prozess; bei ektopischer Expression von MBP in der Haut kommt es nicht zu einer Induktion von protektiven iTregs (Lüth et al. 2008). Mithilfe von Nanopartikeln gelang das Einbringen von Autoantigenen zu den Treg-induzierenden LSECs in der Leber, was einen anhaltenden Schutz vor EAE-Induktion bewirkte und bereits bestehende EAE-Symptome deutlich linderte; die Entwicklung eines therapeutischen Verfahrens auf dieser Grundlage erscheint vielversprechend (Carambia et al. 2015).

Weiterhin werden antigenspezifische Tr1 Zellen, die aus Th1-Zellen unter dem Einfluss des Chemokins CXCL12 zu CD4+CD25-Foxp3-IL10^{high} Zellen differenzieren, als protektive Faktoren diskutiert, da sie eine bestehende EAE supprimieren können. Neben IL-10-abhängigen scheinen jedoch weitere IL-10-unabhängige Mechanismen zu bestehen (Meiron et al. 2008).

Für die vorliegende Arbeit wurde mit transgenen Mäusen der Linie CRP-MBP gearbeitet. Aufgrund des humanen C-reaktiven Protein (CRP)-Promotors, der spezifisch in Hepatozyten exprimiert wird, erfolgt in diesem Stamm die konstitutive ektopische Expression von MBP in den Hepatozyten der Leber (Weinhold & Rüther 1997). Um die Suszeptibilität gegenüber einer EAE-Induktion zu gewährleisten, wurde die Linie mit dem B10.PL-Hintergrund gekreuzt. Mäuse der tg4 Linie wiederum, ebenfalls auf dem B10.PL Hintergrund, exprimieren transgen einen für das MBP-Peptid Ac1-9 spezifischen T-Zell-Rezeptor; sie entwickeln keine spontane EAE, sind aber für eine EAE-Auslösung suszeptibel (G. Y. Liu et al. 1995). Diese Linie wurde daher mit den CRP-MBP Tieren gekreuzt, um so die grundlegende Fähigkeit zur Immunreaktion gegen MBP sicherzustellen.

Weiterhin wurde in dem Nonamer Ac1-9 die Aminosäure Lysin an Position vier durch Tyrosin ersetzt, was die Affinität zum MHC II-Komplex erhöht und so eine effizientere Aktivierung von Lymphozyten zur Folge hat (Lüth et al. 2008).

1.7 Zielsetzung

Im EAE-Tiermodell zeigten sich CRP-MBP Mäuse, die das Autoantigen MBP ektopisch in der Leber exprimieren, vor einer EAE geschützt. Zurückgeführt werden kann dies auf eine TGF- β -abhängige Generierung von antigenspezifischen Foxp3+ Tregs in der Leber aus konventionellen CD4+ T-Zellen. Als potentester Induktor der protektiven MBP-spezifischen Tregs konnten LSECs identifiziert werden (Lüth et al. 2008; Carambia et al. 2014).

In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, ob T regulatorische Zellen entscheidend für die Induktion und Aufrechterhaltung der Immuntoleranz in der Leber sind und inwieweit darüber hinaus auch andere Toleranzmechanismen eine Rolle spielen. Hierfür wurden Mäuse der Linie CRP-MBP x tg4 verwendet, die zusätzlich zu der ektopischen MBP-Expression in Hepatozyten noch über einen transgenen T-Zell-Rezeptor verfügen, der spezifisch für das MBP ist.

Anknüpfend an die Arbeit von Alena Laschtowitz (Laschtowitz 2018) sollte dieses Modell weiter analysiert werden. Es konnte in Vorarbeiten gezeigt werden, dass trotz des Vorliegens antigenspezifischer CD4+ T-Zellen keine EAE induzierbar war; zugleich wurde eine erhöhte Frequenz antigenspezifischer Tregs gefunden. Zunächst sollte daher eine genauere Charakterisierung des Modells erfolgen, wofür die Expression des tg4 TCR der MBP-

spezifischen CD4⁺ T-Zellen in verschiedenen Organen betrachtet wurde. Die Funktionalität der Zellen wurde u.a. anhand der Zytokinproduktion nach *in vitro* Stimulation und bei *in vivo* Versuchen untersucht.

Ein zweiter Schwerpunkt wurde auf die Untersuchung der Rolle von Tregs und die Aufdeckung Treg-unabhängiger redundanter Mechanismen gelegt: hierzu zählten Tr1 Zellen sowie tolerogene Zytokine wie IL-10 und TGF- β . Dabei wurden die potentiellen Suppressionsmechanismen einzeln und in Kombination betrachtet. Auch eine genauere Analyse der in der Literatur als koinhibitorisch beschriebenen Oberflächenmoleküle CTLA-4 und PD-1 wurde unternommen, um zusammengekommen Erkenntnisse über die Mechanismen der Immuntoleranz in der Leber zu gewinnen.

Folgende Fragestellungen wurden im Speziellen bearbeitet:

1. Weitere Charakterisierung des CRP-MBP x tg4 Mausmodells:
 - a. Besitzen CRP-MBP x tg4 Mäuse MBP-spezifische T-Zellen oder findet eine Deletion dieser autoreaktiven Zellen im Thymus statt?
 - b. Ist die Bildung von MBP-spezifischen T-Zellen in Tieren, die über eingeschränkte TGF- β - oder IL-10-Signalwege verfügen, eingeschränkt?
 - c. Zeigen sich die MBP-spezifischen T-Zellen *in vitro* und *in vivo* reaktiv und funktional?
2. Untersuchung von Mechanismen der hepatischen Immuntoleranz:
 - a. Welche Rolle spielen der TGF- β - und IL-10-Signalweg für die Induktion und Aufrechterhaltung der hepatischen Immuntoleranz?
 - b. Welche Bedeutung kommt TGF- β und IL-10 bei kombinierter Betrachtung ihrer Signalwege für die hepatische Immuntoleranz zu?
 - c. Sind in dem untersuchten Modell Tr1 Zellen an der hepatischen Immuntoleranz beteiligt?
 - d. Spielen weitere immunsuppressive oder immunmodulatorische Mechanismen eine Rolle für die Aufrechterhaltung der hepatisch induzierten Toleranz?

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

Geräte	Hersteller
Analysewaage „Scout Pro“	Ohaus, Nänikon, Schweiz
Autoklav „VX-120“	Systec GmbH, Wettenberg
CO ₂ Inkubator	SANYO Biomedica, München
DNA Engine Dyad® Peltier Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Durchflusszytometer „LSR II“	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometer „LSR Fortessa™“	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometer „FACSAria™ Illu“	BD Biosciences, Heidelberg
ELISA-Auslesegerät „Opsys MRX TC II“	Dynex Technologies, Denkendorf
ELISA-Auslesegerät „Infinite F50“	Tecan, Männedorf, Schweiz
Fluoreszenz-Mikroskop „BZ9000 (BIO-REVO)“	KEYENCE, Neu-Isenburg
Lichtmikroskop „Axiovert 40 CFL“	Carl Zeiss Microimaging, Jena
Lichtmikroskop Leica DM IRB	Leica Microsystems, Wetzlar
Magnetrührer „MR 3001 K“	Heidolph Instruments, Schwabach
Magnetständer „MACS® MultiStand“	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikrotom (HM 335 E)	Microm, Walldorf
Neubauer Zählkammer	Optik Labor Frischknecht, Balgach
Perfusionspumpe	DYNEX Technologies GmbH, Denkendorf
Photometer MRX TC II	DYNEX Technologies GmbH, Denkendorf
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe, Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Präparationsbesteck	VWR International GmbH, Darmstadt
Real-Time PCR System „StepOne Plus™“	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Schüttelwasserbad „GFL 1083“	GFL - Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Sicherheitswerkbank „Lamin Air“	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Spektrophotometer „NanoDrop2000“	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Trennmagnet „QuadroMACS™“	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Thermomixer „comfort“	Eppendorf AG, Hamburg
Tisch-pH/Ionen Messgerät „Seven Compact™ S220“	Carl Roth, Karlsruhe
Tischzentrifuge „Biofuge pico“	Heraeus Instruments, Osterode
Vortex „Reax 2000“	Heidolph Instruments, Schwabach
Zentrifuge „5810R“	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge „Megafuge 2.0“	Heraeus Instruments, Osterode

2.2 Materialien

Materialien	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
4YMBP (Acetyl-ASQYRPSQR-COOH), Myelin Basisches Protein-Peptid	Panatecs, Heilbronn
Adjuvant Complete Freund (CFA)	Difco Laboratories, Detroit; USA
Anti-APC MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Anti-FITC MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Anti-PE MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti Horseradish Peroxidase (HRPN); <i>Invi</i> -voMAb Rat IgG1 Isotype control	BioXCell, West Lebanon; USA

anti Trinitrophenol; <i>InVivo</i> MAb Rat IgG2a (Klon: 2A3) Isotype control	BioXCell, West Lebanon; USA
Anti m CD25 <i>InVivo</i> MAb (Klon: PC-61.5.3)	BioXCell, West Lebanon; USA
Anti m CD152 (m CTLA-4) <i>InVivo</i> MAb (Klon: UC10-4F10-11)	BioXCell, West Lebanon; USA
Anti m IL10R Antikörper (<i>Hybridom</i>)	<i>freundlicherweise bereitgestellt von AG Samuel Huber</i>
Anti m PD-1 <i>InVivo</i> MAb (Klon: RMP1-14)	BioXCell, West Lebanon; USA
Aqua ad iniectabilia	Baxter, Unterschleißheim
BD FACS Flow™	BD Biosciences, Heidelberg
BD Golgi Plug	BD Biosciences, Heidelberg
Bovines Serumalbumin (BSA) Fraction V	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Calciumchlorid (CaCl ₂) x 2H ₂ O	Merck, Darmstadt
CellTrace™ Violet stain	Invitrogen, Darmstadt
CD4 (L3T4) MicroBeads, mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD11c MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Click's Medium (EHAA)	Irvine Scientific, Santa Ana; USA
CryoPure Gefäß (1,6ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläser	Marienfeld-Superior, Lauda-Königshofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Einbettkassetten	Kabe Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth
Eindeckmedium Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol (70%)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Fc-Block, Anti-Mouse CD16/CD32	eBioscience, Frankfurt
Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
Flüssig-Stickstoff (N ₂)	Linde AG, Pullach
Hämatoxylin	Carl Roth, Karlsruhe
Heparin-Natrium (25.000 I.E.)	Ratiopharm GmbH, Ulm
IMDM Medium	Invitrogen, Darmstadt
<i>InVivo</i> MAb Polyclonal Armenian Hamster IgG, Isotype control	BioXCell, West Lebanon; USA
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Kanülen, BD Microlance	BD Biosciences, Heidelberg
KAPA Probe Fast „ROX High (50X)“	PEQLAB, VWR International, Erlangen
KAPA Probe Fast „qPCR Master Mix (2x)“	PEQLAB, VWR International, Erlangen
Ketamin	aniMedica GmbH, Senden
Kompensationspartikel „OneComp eBe-ads“	eBioscience, Frankfurt
M. Tuberculosis H37 RA	Difco Laboratories, Detroit; USA
MACS® Pre-Separation Filters	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS® Separation LS-Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Maxisorp® Nunc Microtiterplatten	eBioscience, Frankfurt
MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Nylonsieb „EASY CellStrainer“ 100µm, 40µm	Greiner bio-one, Frickenhausen
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe

Objektträger Superfrost®	Menzel GmbH, Braunschweig
Optiprep™ Density Gradient Medium	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pacific Orange Succinimidyl Ester (PacO-NHS)	Invitrogen, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Darmstadt
Pertussis Toxin from Bordetella Pertussis	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Purified NA/LE Hamster Anti-Mouse CD28	Biologend, Fell
Purified NA/LE Hamster Anti-Mouse CD3ε	Biologend, Fell
Reaktionsgefäße 1,5ml, 2ml, 5ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 15ml, 50ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Röhren, Flow Cytometry	Sarstedt, Nümbrecht
Roti®-Histofix 4%	Carl Roth, Karlsruhe
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄) Lösung (2N)	Carl Roth, Karlsruhe
Serologische Pipetten, Stabpipetten	Greiner bio-one, Frickenhausen
Spritzen, BD Plastipak	BD Biosciences, Heidelberg
Sterilfilter „Filtropur V50“	Sarstedt, Nümbrecht
TMB Plus ready-to-use Substrate	Kementec Diagnostics, Köln
Trypanblau (0,4%)	Invitrogen, Darmstadt
Tween® 20	Merck, Darmstadt
Untersuchungshandschuhe „Nitra-Tex®“	Ansell Healthcare, Brüssel; Belgien
Verschlussfilm „Rotilabo®“	Carl Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid 30% (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt
Xylol	O. Kindler GmbH, Freiburg
Zellkulturplatten Flachboden, Rundboden; 96-well Format	Sarstedt, Nümbrecht

2.3 qPCR-Sonden

Primer-Sonde	Gen	Hersteller; Sonden-Identifikationsnummer
Ahr	Aryl hydrocarbon receptor	TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystems, Foster City; USA Mm00478932_m1
Ctla-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystems, Foster City; USA Mm00486849_m1
Ebi3 (Il27)	Epstein-Barr virus (EBV)-induced gene 3 (bildet eine Untereinheit des Interleukin 27)	TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystems, Foster City; USA Mm00469294_m1
Gzmb	Granzyme B	TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystems, Foster City; USA Mm00442837_m1
Hprt	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (Housekeeping-Gen)	TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystems, Foster City; USA Mm03024075_m1
Il10	Interleukin 10	TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystems, Foster City; USA Mm01288386_m1
Il27 (p28)	Interleukin 30 (bildet eine Untereinheit des Interleukin 27)	TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystems, Foster City; USA Mm00461162_m1

Il6	Interleukin 6	TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystems, Foster City; USA Mm00446190_m1
Maf	Transkriptionsfaktor c-Maf	TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystems, Foster City; USA Mm02581355_s1
Pdcd1 (PD-1; CD 279)	Pdcd1 kodiert für PD-1 (Programmed Cell Death Protein 1), auch bekannt als CD279	TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystems, Foster City; USA Mm01285676_m1
Prdm1 (Blimp1)	PR domain zinc finger protein 1 (B lymphocyte-induced maturation protein 1)	TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystems, Foster City; USA Mm00476128_m1
Tgfb1	Transforming growth factor beta 1	TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystems, Foster City; USA Mm01178820_m1

2.4 Kits

Kits	Hersteller
Foxp3 Transcription Factor Staining Buffer Set	eBiosciences, Frankfurt
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
mouse IFN-γ DuoSet ELISA Development Kit	R&D Systems, Wiesbaden
mouse IL-17 DuoSet ELISA Development Kit	R&D Systems, Wiesbaden
NucleoSpin® RNA Purification Kit	Macherey-Nagel, Düren

2.5 Durchflusszytometrie – Antikörper

FACS-Antikörper	Klon	Hersteller
CD3-FITC	17A2	BioLegend
CD3-Brilliant Violet 421	17A2	BioLegend
CD3-Alexa Fluor 700	17A2	BD Biosciences
CD3ε-PE	145-2C11	BioLegend
CD4-PE/Dazzle 594	RM4-5	BioLegend
CD4-Brilliant Violet 421	GK1.5	BioLegend
CD4-FITC	RM4-4	BD Biosciences
CD8-APC	53-6.7	BioLegend
CD8-V450	53-6.7	BD Biosciences
CD8-Alexa Fluor 700	53-6.7	BioLegend
CD8a-FITC	53-6.7	BioLegend
CD25-PE	PC61.5	BioLegend
CD45.1-APC	A20	BioLegend
CD45.1-Alexa Fluor 700	A20	BioLegend
CD45.1-FITC	A20	BioLegend
CD45.2-APC	104	BioLegend
CD45.2-Brilliant Violet 421	104	BioLegend
CD45.2-FITC	104	eBiosciences
CD45.2-PE	104	BioLegend
CD49b-PE	HMa2	BioLegend
CD210 (IL-10 R)-PE	1B1.3a	BioLegend
CD223 (LAG-3)-APC	C9B7W	BioLegend

CD279 (PD-1)-Brilliant Violet 421	29F.1A12	BioLegend
CTLA-4-PE	UC10-4F10-11	BD Biosciences
Foxp3-APC	FJK-16s	eBiosciences
Foxp3-FITC	FJK-16s	eBiosciences
Foxp3-Alexa Fluor 700	FJK-16S	eBiosciences
IFN- γ -Alexa Fluor 700	XMG1.2	BD Biosciences
IL7R α (CD127)-PE	A7R34	eBiosciences
IL7R α (CD127)-APC	A7R34	eBiosciences
IL-17A-PE	TC11-18H10.1	BD Biosciences
TCR-beta-chain-AF647	H57-597	BioLegend
V β 8.1, 8.2 TCR-FITC	MR5-2	BD Biosciences
V β 8.1, 8.2 TCR-PE	MR5-2	BD Biosciences

2.6 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
1x ACK-Erythrozyten-Lysepuffer	NH ₄ Cl 150mM KHCO ₃ 10mM EDTA 100mM
1x PBS (pH 7,4)	KCL 2,7mM KH ₂ PO ₄ 1,5 mM NaCL 137 mM Na ₂ HPO ₄ 6,5 mM
4%-ige Formalinlösung (gepuffert)	9,07g KH ₂ PO ₄ 66mM 11,86g Na ₂ HPO ₄ 66mM 860ml H ₂ O 140ml Formalin (37%) (pH 7,4)
MACS-Puffer	1x PBS 0,5% BSA 2.5 mM EDTA
Perm/Wash™ 10x (eBiosciences, Frankfurt)	1 Anteil Perm/Wash™ 10x 9 Anteile H ₂ O
Saponin-Puffer	1x PBS 1% BSA 0,5% Saponin

2.7 Software

Produkt	Hersteller
FACS Diva 6	BD Pharmingen, Heidelberg
GraphPad Prism®	GraphPad Software, Inc., San Diego, USA
Magellan for F50 Software	Tecan, Männedorf, Schweiz
NanoDrop 2000/2000c Software (Version 1.6.198)	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
StepOne™ Software (Version 2.1)	Thermo Fischer Scientific, Schwerte

2.8 Versuchstiere

Die Züchtung und Haltung der verwendeten Mäuse erfolgte unter spezifisch pathogen-freien Bedingungen in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Sämtliche Tierversuche erfolgten mit Genehmigung der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg.

Linie	Hintergrund	Besonderheiten
tg4	B10.PL-H2uH2-T18a/(73NS)SnJ (im Folgenden: B10.PL)	MBP-spezifischer T-Zell-Rezeptor
(CRP-MBP) – CD45.1/2	C57BL/6 x B10.PL F1	Ektopische Expression von MBP in der Leber unter dem CRP-Promotor
(CRP-MBP x tg4) – CD45.1/2	C57BL/6 x B10.PL	
(CRP-MBP x hCD2-ΔkTβR II x tg4)	C57BL/6 x B10.PL	TGF-β-insensitive T-Zellen (besitzen einen dominant-negativen TGF-β-Rezeptor II)
(CRP-MBP x <i>cd4</i> -DN-IL10R x tg4)	C57BL/6 x B10.PL F1	T-Zellen verfügen über einen dominantnegativen IL-10-Rezeptor
(K5-MBP) – CD45.1/2	C57BL/6 x B10.PL F1	Ektopische Expression von MBP in der Haut unter dem Keratin 5-Promotor
(K5-MBP x tg4) – CD45.1/2	C57BL/6 x B10.PL F1	Ektopische Expression von MBP in der Haut unter dem Keratin 5-Promotor und MBP-spezifische T-Zellen
(Foxp3gfp.KI x tg4)	C57BL/6 x B10.PL F1	Foxp3 ⁺ Zellen zeigen eine grüne Fluoreszenz
(CRP-MBP x foxp3gfp) – CD45.1/2	C57BL/6 x B10.PL F1	
(CRP-MBP x tiger x tg4)	C57BL/6 x B10.PL	IL10 ⁺ Zellen zeigen eine grüne, Foxp3 ⁺ Zellen eine rote Fluoreszenz (x-chromosomal)

Als Kontrolltiere zu den oben aufgeführten Mauslinien wurden die jeweiligen nicht-transgenen Wurfgeschwister verwendet.

2.9 Aufreinigung der Zellpopulationen

2.9.1 Isolation von CD4+ T-Lymphozyten aus der Milz und aus dem Thymus

Die Mäuse wurden vor der Organentnahme mit Ketamin-Xylazin (Ketamin: Rompun: PBS = 1: 0,8: 1; 200µl/ Maus, intraperitoneal) narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Nach Entnahme der Milz wurden die weiteren Schritte unter sterilen Bedingungen mit steril filtrierten Medien durchgeführt. Die entnommene Milz wurde unter Zugabe von PBS durch ein Sieb (Ø100µm) in ein 50ml Reaktionsgefäß gedrückt und die aufgefangene Zellsuspension mit PBS gewaschen. Dies erfolgte durch Auffüllen des Reaktionsgefäßes mit PBS und anschließender Zentrifugation unter Standardbedingungen (430G, 5min, Raumtemperatur); der Überstand wurde abpipettiert. Um die Erythrozyten zu lysieren, wurden die Zellen in ACK-Puffer resuspendiert (1ml/Milz) und eine Minute lang schwenkend inkubiert, bevor die Erythrozytenlyse durch Zugabe von 20ml PBS gestoppt wurde. Die Zellsuspension wurde daraufhin erneut durch ein Sieb (Ø40µm) gegeben, gewaschen und in PBS aufgenommen, sodass die Zellzahl mithilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt werden konnte. Bei Isolation der Zellen aus dem Thymus wurde weitgehend identisch verfahren, lediglich die Erythrozytenlyse mittels ACK-Puffer wurde nur bei Bedarf, nicht aber standardmäßig, durchgeführt.

Da die folgende Zellsortierung über das „Magnetic Activated Cell Sorting“ (MACS) erfolgte, wurden die Lymphozyten nach abermaliger Zentrifugation in MACS-Puffer (1ml/10⁸ Zellen) resuspendiert sowie mit magnetischen anti-CD4-MicroBeads (100µl/10⁸ Zellen) für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Während der darauffolgenden Waschung der Zellen und Wiederaufnahme in MACS-Puffer (1ml/10⁸ Zellen) wurden pro Probe 2 LS-Säulen in den Magnetständer eingespannt, die mit je 3ml kaltem MACS-Puffer äquilibriert wurden. Nun wurde die Probe auf die erste Säule aufgetragen. Nachdem sie durchgelaufen war, erfolgte dreimal eine Spülung der Säule mit 3ml MACS-Puffer; der Durchfluss wurde verworfen. Die magnetisch an die Säule gekoppelten CD4+ T-Zellen wurden eluiert, indem die Säule aus dem Magnetständer entfernt, mit 5ml MACS-Puffer aufgefüllt und der Inhalt mithilfe eines Stempels in die zweite äquilibrierte Säule gedrückt wurde. Diese zweite Säule wurde ebenfalls dreimalig mit 3ml MACS-Puffer gespült, bevor die Elution nach demselben Prinzip in ein steriles 15ml Auffanggefäß erfolgte. Die Reinheit der so isolierten CD4+ T-Zellen betrug über 95%.

2.9.2 Isolation von CD4+CD25+ und CD4+CD25- T-Lymphozyten aus der Milz

Die Herstellung der Einzelzellsuspension aus der Milz inklusive Erythrozytenlyse erfolgte wie oben beschrieben; die Zellen wurden dann in MACS-Puffer (1ml/10⁸ Zellen) aufgenommen und mit anti-CD25-PE-gekoppelten Antikörpern (10µl/ml/10⁸ Zellen) inkubiert (10min, 4°C). Abermals wurden die Zellen gewaschen und in MACS-Puffer resuspendiert, bevor sie mit magnetischen anti-PE-MicroBeads (100µl/ml/10⁸ Zellen) für 10min bei 4°C inkubiert wurden. Es folgten ein weiterer Waschschriff und das Überführen der Zellen auf eine äquilibrierte LS-Säule. Sollten die in der Säule magnetisch gebundenen CD25+ T-Zellen isoliert werden, wurden diese aus der Säule eluiert und nach demselben Verfahren über eine zweite äquilibrierte Säule gegeben. Andernfalls wurde der Durchfluss, in dem sich die CD25- Zellen befanden, aufgefangen. In beiden Fällen erfolgte danach die CD4+ Aufreinigung nach Standardprotokoll wie unter 2.9.1 beschrieben.

2.9.3 Isolation von CD11c+ dendritischen Zellen (DC) aus der Milz

Zur Gewinnung der Dendritischen Zellen wurde wie oben beschrieben eine Einzelzellsuspension aus der Milz hergestellt; die Erythrozyten wurden lysiert. Die Milz-Lymphozyten wurden in MACS-Puffer ($1\text{ml}/10^8$ Zellen) resuspendiert und mit magnetischen anti-CD11c-MicroBeads ($25\mu\text{l}/\text{ml}/10^8$ Zellen) für 15min bei 4°C inkubiert. Es folgte ein Waschvorgang, bevor die Zellen auf eine äquilibrierte LS-Säule aufgebracht und dreimalig mit MACS-Puffer gespült wurden. Die gebundenen CD11c+ Zellen wurden wie oben beschrieben eluiert und aufgefangen; die Reinheit der so isolierten DC-Population betrug über 90%.

2.9.4 Isolation nichtparenchymatöser Zellen (NPC) aus der Leber

Für die Isolation von NPCs aus der Leber wurden die Versuchstiere narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet, bevor das Peritoneum eröffnet und die Leber freipräpariert wurden. Die *Vena cava inferior* wurde ebenfalls geöffnet; die Perfusion der Leber mit PBS ($10\text{ml}/\text{min}$) erfolgte über die Pfortader für 20 bis 30 Sekunden. Anschließend wurde die Leber herauspräpariert und die Gallenblase entfernt. Die folgenden Schritte wurden unter sterilen Bedingungen mit steril filtrierten Medien durchgeführt.

Die Lebern wurden mithilfe eines Spritzenstempels durch ein Sieb ($\varnothing 100\mu\text{m}$) in ein 50ml Auffanggefäß passiert, mit PBS aufgefüllt und zentrifugiert (40G, 4min, Raumtemperatur). Dabei wurden die Hepatozyten pelletiert und verworfen, nachdem der Überstand mit den darin befindlichen NPCs abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Es folgten eine weitere Zentrifugation (40G, 4min, Raumtemperatur) sowie die Überführung des gewonnenen Überstandes in ein neues 50ml Reaktionsgefäß. Dieses wurde unter erhöhter Drehzahl (430G, 7min, Raumtemperatur) zentrifugiert, um die NPCs zu pelletieren. Das entstandene Zellpellet wurde in exakt 4,5ml PBS resuspendiert, dann in ein vorbereitetes 15ml Reaktionsgefäß mit darin befindlichen 2,5ml raumtemperiertem OptiPrep® überführt und vorsichtig durchmischt. Die Zellsuspension wurde mit 1ml PBS überschichtet, bevor dieser Dichtegradient 20min bei 400G und Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert wurde, um eine Auftrennung der Zellpopulationen zu erreichen.

Die Interphase, in der sich die nichtparenchymatösen Zellen anreichern, wurde vorsichtig abgenommen, in ein 15ml Reaktionsgefäß überführt, gewaschen und mittels ACK-Puffer (siehe oben) einer Erythrozytenlyse unterzogen. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen in 1ml MACS-Puffer bzw. Medium aufgenommen, in der Neubauer-Zählkammer gezählt und bis zur anschließenden Färbung, MACS-Isolation oder Stimulation bei 4°C kühl gelagert.

2.10 Zellkultur

2.10.1 Zellzahlbestimmung

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurde die Zellsuspension entsprechend der prognostizierten Zellzahl in Trypanblaulösung (1:10 Trypanblau:PBS) verdünnt und in die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Für jede Probe wurden zwei diagonal gegenüber liegende Großquadrate unter einem Lichtmikroskop ausgezählt; bei geringer Zellzahl wurden alle vier Großquadrate einbezogen. Die Bestimmung der Zellvitalität wurde durch die Blaufärbung toter Zellen ermöglicht.

Mithilfe folgender Formel wurde die Gesamtzellzahl berechnet:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Großquadrate}} \times \text{Volumen der Zellsuspension [ml]} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor } (10^4)$$

2.10.2 Zellkulturmedien

Sollten frisch isolierte CD4⁺ T-Zellen aus Milz oder Leber kultiviert werden, gegebenenfalls als Kokultur mit Dendritischen Zellen oder Antigenpräsentierenden Zellen, wurde mit IMDM-Medium, das mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% L-Glutamin angereichert wurde, gearbeitet. Suppressionsassays bzw. Proliferationstests wurden dagegen in mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 2% L-Glutamin (20ml/l) und β -Mercaptoethanol (0.04mM) angereichertem Click's Medium durchgeführt.

2.10.3 Restimulation der Zellen zur Detektion von Zytokinen im Zellkulturüberstand

Nach der Zentrifugation wurden die CD4⁺ T-Zellen in Kulturmedium IMDM (10% FCS, 1% P/S, 1% L-Glutamin) aufgenommen (2×10^6 Zellen/ml) und in einer 96well-Zellkulturplatte mit 5×10^5 CD4⁺ T-Zellen je Kavität in einem Füllungsvolumen von 250 μ l/well ausgesät, um sie zu restimulieren. Für eine unspezifische Stimulation wurden anti-CD3 AK und anti-CD28 AK (je 2 μ g/ml) in gelöster Form hinzugegeben oder ausschließlich anti-CD3 AK zusammen mit 5×10^4 DC (CD11c⁺). Sollte antigenspezifisch stimuliert werden, so wurde neben 5×10^4 DC (CD11c⁺) auch ein modifiziertes, aminoterminal acetyliertes Peptid des Myelin Basischen Proteins (4YMBP) in unterschiedlichen Konzentrationen (10-100ng/ml) hinzugefügt. Die Zellkulturüberstände wurden nach 72 oder 96 Stunden Inkubation im Brutschrank (37°C) abgenommen und für weitere Analysen bei -20°C eingefroren.

2.11 Charakterisierung der Zellen

2.11.1 Ausschluss toter Zellen

Um tote Zellen zu identifizieren und von der Analyse mit dem Durchflusszytometer ausschließen zu können, wurden die Zellen mit Pacific Orange Succinimidyl Ester (PacO-NHS) gefärbt. In lebendige Zellen mit intakter Zellmembran kann dieser Farbstoff nicht eindringen; bei toten Zellen gelangt er über die zerstörte Membran ins Zellinnere, bindet dort an freie Amine und färbt so ausschließlich die toten Zellen, sodass eine Unterscheidung ermöglicht wird.

Für die Färbung wurden die Zellen in 200µl einer verdünnten PacO-NHS-Lösung (1:1000 in PBS) resuspendiert und 25min bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und für weitere Färbungen in PBS/2%BSA aufgenommen oder in 4% PFA fixiert (15min, 4°C). Auf die Fixierung folgte ein weiterer Waschgang, nach welchem die Zellen in 300µl PBS aufgenommen wurden und mittels Durchflusszytometrie analysiert werden konnten.

2.11.2 Färbung von Oberflächenmarkern

Zur Analyse der in PBS/2%BSA aufgenommenen Zellen (10^5 - 5×10^6 Zellen/100µl) erfolgte eine Färbung der Oberflächenantigene mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern. Hierfür wurden die Zellen in 5ml Röhrchen transferiert, mit je 1µL Antikörper/Probe gefärbt und 15min bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Nach dem anschließenden Waschen der Zellen mit PBS (Zentrifugation 400G, 5min) und Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen mit PFA fixiert (4%, 15min, 4°C), danach erneut gewaschen und in 300µl PBS aufgenommen. Bis zur Analyse mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellen bei 4°C in Dunkelheit gelagert. Sollte eine Färbung des intrazellulären Transkriptionsfaktors Foxp3 erfolgen, unterblieb die Fixierung mit PFA.

2.11.3 Färbung von CD4+CD25+Foxp3+ regulatorischen T-Zellen

Auf die oben beschriebene Oberflächenfärbung von CD4 und CD25 (ohne Fixierung) folgte ein Waschvorgang mit PBS und die Färbung des intrazellulären Transkriptionsfaktors Foxp3 mithilfe des Foxp3/Transcription Staining Buffer Set (eBioscience) weitgehend nach Herstellerangaben. Lediglich hinsichtlich der Waschschrte wurde das Herstellerprotokoll leicht modifiziert: 500µl (statt 1ml) Permeabilisierungspuffer wurden verwendet. Die Zellen wurden nach der Fixierung und Permeabilisierung mit Permeabilisierungspuffer gewaschen, in 20µl Permeabilisierungspuffer resuspendiert und mit Fc-Block (0,2µl/Probe) für 15min bei 4°C inkubiert. Hiernach wurde der Foxp3-AK (1µl/Probe) ohne weiteren Waschgang direkt hinzugegeben, die Färbung erfolgte über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Permeabilisierungspuffer gewaschen, in 300µl PBS aufgenommen und bis zur Analyse bei 4°C in Dunkelheit gelagert.

2.11.4 Färbung von T-Zellen des CD49b+Lag-3+ Typ 1 regulatorischen Phänotyps

Die Färbung von Typ 1 regulatorischen T-Zellen erforderte ein leicht modifiziertes Färbeprotokoll: Nach Aufnahme der Zellen in PBS und Zugabe der Antikörper gegen CD49b und Lag-3 (je 1µl AK/Probe; wie oben beschrieben) wurden die Proben 15min bei 37°C inku-

biert. Anschließend folgte eine weitere Inkubation über 15min bei Raumtemperatur in Dunkelheit. Daraufhin wurden die Zellen gewaschen und mit dem oben beschriebenen Verfahren auf Foxp3-Expression gefärbt.

2.11.5 Färbung von tiger-Maus-Zellen

Sofern mit Zellen gearbeitet wurde, die aus der *tiger*-Linie stammten, musste deren intrinsische, durch einen x-chromosomalen Knock-in bedingte Fluoreszenz der Zellen berücksichtigt werden. Dies schloss ein Arbeiten unter lichtarmen Bedingungen ein, um einen lichtbedingten Zerfall der Farbstoffe zu verhindern. Auch konnten die Zellen nicht fixiert werden, da dies ebenfalls eine Störung des Fluoreszenzsignals zur Folge gehabt hätte; sollte eine FACS-Analyse erfolgen, musste diese also mit unfixierten Zellen zeitnah durchgeführt werden.

2.11.6 Durchflusszytometrie

Die Analyse der gefärbten und fixierten Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie (LSR II bzw. LSR Fortessa). Zur Kompensation der unterschiedlichen, ineinander strahlenden Fluoreszenzkanäle wurden Proben mit Einzelfärbungen der Fluorochrome angefertigt und eingelesen. Die Hintergrundfluoreszenz der verwendeten Antikörper wurde durch passende gefärbte Isotypkontrollen erfasst; auch eine Probe mit ungefärbten Zellen wurde aufgenommen, um die Autofluoreszenz der Zellen zu berücksichtigen.

Die Messung und Auswertung, für die tote Zellen und Dubletten aus der Analyse ausgeschlossen wurden, erfolgte mit der BD FACSDiva Software 6.

Sollten Zellen hinsichtlich gewisser Merkmale lebendig sortiert werden, um z.B. für eine Stimulation eine definierte Population zu erhalten, erfolgte dies mit einem FACS Aria IIIu in der FACS Sorting Core Unit des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

2.11.7 Bestimmung der Anzahl Leber-infiltrierender CD4+ T-Zellen

Die gezählte Anzahl nichtparenchymatöser Zellen jeder Probe wurde mit dem per Durchflusszytometrie ermittelten prozentualen Anteil der CD4+ T-Zellen multipliziert, um die absolute Anzahl an CD4+ T-Zellen in der Leber zu berechnen. Dieser Wert wurde dann auf 1g Lebergewebe bezogen, was durch die ursprüngliche Gewichtsbestimmung der verwendeten Leberproben bei Entnahme möglich war.

2.11.8 Zytokinbestimmung im Zellkulturüberstand mittels ELISA

Für die Bestimmung von Zytokinen im Zellkulturüberstand wurde mit dem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) gearbeitet. Bei diesem Verfahren werden zwei verschiedene Antikörper genutzt, die spezifisch unterschiedliche Epitope desselben Moleküls erkennen. Die Kavitäten einer Microtiterplatte werden mit dem ersten Antikörper ausplattiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurden nicht gebundene Antikörper durch einen Waschvorgang entfernt, bevor zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen der Blockpuffer (PBS/1%BSA) hinzugegeben wurde. Nach erneutem Waschen wird der Zellkulturüberstand zugegeben und das darin befindliche, zu detektierende Molekül bindet an den Erstantikörper. Nun folgen, jeweils nach Waschschritten, Inkubationen mit dem biotinylierten Zweitantikörper und Streptavidin-gekoppelter Meerrettich-Peroxidase, welche das Biotin des Zweitantikörpers erkennt und bindet. Nach Zugabe des Substrats tritt eine

Farbreaktion ein, die bei ausreichender Ausprägung mit der angegebenen Stopp-Lösung beendet wird und dann photometrisch gemessen werden kann. Die gemessene optische Dichte kann anhand des bei jeder Messung mitgeführten Standards in eine Zytokinkonzentration umgerechnet werden.

Die Messungen erfolgten mit Kits von R&D Systems entsprechend der beiliegenden Protokolle unter Verwendung von Tetramethylbenzidin (TMB Plus READY-TO-USE, fertige Gebrauchslösung) als Substratlösung. Anschließend wurden die Proben mit dem ELISA-Auslesegerät Opsys MRX TC II (Dynec Technologies GmbH) bzw. Infinite F50 (Tecan GmbH) bei einer Wellenlänge von 450nm ausgelesen und die Konzentration des Zytokins ermittelt.

2.12 Genexpressionsanalyse

2.12.1 RNA-Extraktion und Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Extraktion zur späteren Genexpressionsanalyse erfolgte entweder aus Lebergewebe, welches unmittelbar nach der Organentnahme in Kryoröhrchen mit Flüssigstickstoff schockgefrostet und bei -80°C gelagert wurde, oder aus einer isolierten, definierten Zellpopulation (z.B. CD4+ T-Zellen).

Die Proben wurden in 2-Mercaptoethanol enthaltenden Lysepuffer überführt, in welchem sie auftauten und mithilfe eines sterilen Mörsers homogenisiert wurden. Das Lysat wurde auf eine Säule gegeben, bei 11000G für eine Minute zentrifugiert und so filtriert. Der Filter mit eventuellen Rückständen wurde verworfen; zu dem homogenisierten Durchfluss wurden 350µl Ethanol (70%) hinzugefügt und durchmischt, bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Daraufhin wurde die in einem Auffanggefäß befindliche RNA-Säule mit dem Lysat beladen und wiederum zentrifugiert (11000G, 1min), sodass die RNA an die Säule band. Um den folgenden DNA-Verdau eventuell verbliebener DNA effektiver zu machen, erfolgte zunächst ein Entsalzungsschritt, bei dem Membranentsalzungspuffer auf die Säule gegeben und zentrifugiert wurde. Sodann wurden 95µl des rDNase-Reaktionsgemisches direkt zentral auf die Membran der Säule pipettiert. Nach fünfzehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die rDNase-Reaktion durch Zugabe von 200µl Puffer und folgender Zentrifugation gestoppt. Zwei weitere Zentrifugationsschritte (je 11000G, 30s bzw. 2min) mit einem anderen Puffer folgten, um die Membran zu waschen und zu trocknen. Die mit der RNA beladene Säule wurde in ein Nuclease-freies Auffanggefäß gestellt, in welches die RNA aus der Säule durch Zugabe von 60µl RNase-freiem Wasser und anschließender Zentrifugation eluiert wurde.

Für die RNA-Extraktion wurde das NucleoSpin RNA Kit (Macherey-Nagel) getreu den Herstellerangaben verwendet. Die Konzentration sowie die Reinheit der extrahierten RNA wurden mit dem Spektrophotometer NanoDrop2000 und der NanoDrop 2000/2000c Software (beides Thermo Fischer Scientific) bestimmt.

2.12.2 Umschreibung in cDNA

Um die Genexpression bestimmen zu können, musste die extrahierte RNA in cDNA umgeschrieben werden, was mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fischer Scientific) nach Protokoll des Herstellers geschah. Es beruht auf dem Prinzip, dass das Enzym Reverse Transkriptase als DNA-abhängige RNA-Polymerase in der Lage ist, an einen RNA-Strang („Template“) einen komplementären DNA-Strang zu synthetisieren.

Der RNA-Teil dieses RNA-DNA-Hybridstranges wird dann durch eine RNase abgebaut, sodass aus dem verbliebenen DNA-Einzelstrang nun ein DNA-Doppelstrang synthetisiert und schließlich vervielfältigt werden kann.

Dem Reaktionsgemisch (mit einem Volumen von 10µl) aus vorgegebenen Verhältnissen von Puffer, einem Mix aus Desoxyribonukleotidphosphaten, Primern, RNase Inhibitor, Nuclease-freiem Wasser und dem Enzym Reverse Transkriptase wurden 500ng der extrahierten RNA (in insgesamt 10µl Wasser gelöst) als Template hinzugefügt, sodass ein Gesamtvolumen von exakt 20µl erreicht wurde. Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte daraufhin mit dem DNA Engine Dyad® Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories GmbH). Die so gewonnene cDNA wurde bis zur Analyse bei -80°C eingelagert.

2.12.3 Messung der Genexpression mittels quantitativer Real-Time-PCR (rt-qPCR)

Die Basis der quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (rt-qPCR) bildet die herkömmliche PCR, ein Verfahren aus drei zyklisch wiederkehrenden Schritten zur Vervielfältigung von DNA. Das Verfahren läuft in einem Thermocycler ab, abhängig vom jeweiligen Protokoll werden zwischen 20 und 50 Zyklen durchlaufen; ein Zyklus besteht aus Denaturierung der Vorlage-DNA, Primerhybridisierung und Elongation. Bei der Denaturierung wird der DNA-Doppelstrang durch Erhitzen auf 94-96°C in seine beiden Einzelstränge getrennt, da bei dieser Temperatur die Einzelstränge verbindenden Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen werden. Hierauf folgt die Hybridisierung der Primer an die Einzelstränge, wozu eine niedrigere Temperatur von 55-65°C benötigt wird, um eine spezifische Anlagerung der Primer zu gewährleisten. Den dritten Teil des Zyklus bildet die Elongation, bei der die Einzelstränge ausgehend vom 3'-Ende der Primer durch das Enzym *Taq*-Polymerase mithilfe der freien Nukleotide zu DNA-Doppelsträngen synthetisiert werden. Für eine funktionierende Amplifikation muss die Temperatur dem Arbeitsoptimum des Enzyms entsprechend gewählt werden (ca. 68-72°C). Das mehrfache Durchlaufen dieser drei Arbeitsschritte führt zu einer exponentiellen Vervielfältigung der DNA-Vorlage.

Bei der rt-qPCR wird zusätzlich eine Quantifizierung der gewonnenen DNA über die Echtzeit-Messung von Fluoreszenz-Signalen ermöglicht. Diese Signale werden in den letzten Zyklen des Laufs ausgewertet (in der sogenannten exponentiellen Phase) und sind proportional zur Menge der synthetisierten DNA-Produkte.

Die verwendeten TaqMan®-Sonden besitzen an einem Ende ein Reporter-Fluorochrom, am anderen Ende einen sogenannten Quencher, der die Reporter-Fluoreszenz durch strahlungsfreie Energieübertragung unterdrückt. Erst wenn nach der Hybridisierung an den DNA-Strang der Quencher durch die 5'-3'-Exonuklease-Funktion der *Taq*-Polymerase abgebaut wird und sich von dem Reporter-Fluorochrom entfernt, kann dessen Fluoreszenz gemessen werden.

Für die rt-qPCR wurden die Kavitäten der MicroAMP Platte mit je 5,7µl Reaktionsgemisch bestehend aus 0,2µl Referenzfarbstoff „ROX High (50X)“, 5µl „qPCR Master Mix (2x)“ (je von PEQLAB, VWR International) und 0,5µl der Primer-Sonde des Zielgens gefüllt. Hinzu kamen 4,3µl cDNA, sodass sich ein Gesamtvolumen von 10µl/well ergab. Für jede Probe wurden doppelte Ansätze erstellt, es wurde generell auf Eis gearbeitet. Die MicroAMP Platte wurde luftblasenfrei mit einer Abdeckfolie verschlossen, anzentrifugiert und mit dem Real-Time PCR System „StepOne Plus™“ gemessen.

2.12.4 Berechnung der relativen Expression mittels der Δ Ct-Methode

Auf jeder qPCR-Platte wurde stets Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (Hprt1) als *housekeeping* Gen mit konstanter Expression mitgeführt, um die relative Expression berechnen zu können. Die Berechnung erfolgte auf Basis einer relativen Quantifizierung nach der Δ Ct-Methode. Der Ct-Wert (engl. *Cycle threshold*) gibt den Zyklus an, bei dem erstmalig die gemessene Fluoreszenz über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt.

Δ Ct berechnet sich aus der Differenz der Ct-Werte von Zielgen und Referenzgen (Δ Ct = target – *housekeeper*), anschließend wird die relative Expression anhand folgender Formel bestimmt:

$$\text{relative Expression} = \frac{1}{2^{\Delta Ct}}$$

Die Normalisierung in Bezug auf die Kontrolle kann daraufhin mit

$$\frac{1}{\text{Mittelwert der relativen Expression der Kontrollen}} \times \text{relative Expression (Probe)}$$

berechnet werden. Die Normalisierung der Ergebnisse erfolgte in Bezug auf die C57BL/6 x B10.PL Kontrollen, deren relative Expression der Gene somit „1“ entsprach.

2.13 Histologie

2.13.1 Fixierung, Entwässerung und Einbettung der Proben

Für die histologische Analyse wurde den Versuchstieren ein Teil des rechten Leberlappens (Lobus dexter) entnommen, in eine Einbettkassette überführt und für 24 Stunden in Formalinlösung (4%, pH 7,5) fixiert. Danach wurden die Proben zwei Stunden in Wasser inkubiert, bevor sie mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (Isopropanol 20%, 40%, 70%) über je eine Stunde entwässert wurden. Bis zur Paraffin-Einbettung im Pathologischen Institut des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf erfolgte die Lagerung der Proben in 70%iger Isopropanol-Lösung bei Raumtemperatur.

2.13.2 Schnitte und Hämatoxilin-Eosin-Färbung

Mithilfe eines Mikrotoms wurden aus den Paraffin-Blöcken Schnitte (3 μ m) angefertigt, in einem Wasserbad gestreckt (40°C) auf Superfrost-Objektträger aufgebracht und über Nacht auf einer Wärmeplatte (40°C) getrocknet. Die Färbung erforderte zu Beginn eine je fünfminütige Inkubation in Xylolbädern (96%), um die Schnitte zu entparaffinieren, bevor sie über eine absteigende Ethanolreihe (100%, 90%, 70%, 50%; jeweils 4min) rehydriert wurden. Auf die Spülung (2min, mit Aqua dest.) folgte die Färbung im Hämalaun-Bad (angesäuert nach Meyer) für 10 Minuten. Anschließend wurden die Proben kurz in Aqua dest. getaucht, 20 Minuten unter fließendem Wasser gebläut und wiederum zwei Minuten in Aqua dest. gestellt. Nun wurden die Proben für eine Minute in angesäuerter Eosinlösung (0,5%, 1 Tropfen Essig auf 100ml) inkubiert, kurz in Leitungswasser gespült und durch eine aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol 5s in 50%, 30s in 70%, 1min in 90%, 2min in 100%, erneut 3min in 100%) entwässert. Als letzter Schritt wurden die Schnitte je drei Minuten in drei Xylolbädern (96%) inkubiert, daraufhin mit Eindeckmedium (Entellan) eingedeckt und durch ein Deckgläschen versiegelt.

2.14 Tiermodell der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE)

2.14.1 MBP-Immunisierung

Das Myelin Basische Protein (MBP) wird als Bestandteil der Myelinscheiden der Nervenzellen im Zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert. Eine Immunisierung mit MBP als Autoantigen induziert daher in den Versuchstieren des B10.PL-Hintergrundes eine autoreaktive Neuroinflammation im ZNS. Bei Mäusen der transgenen CRP-MBP Linie wird MBP zusätzlich ektopisch unter dem Promotor des C-reaktiven Proteins (CRP) in der Leber exprimiert.

Die MBP-Immunisierung der geschlechts- und altersgematchten Versuchstiere erfolgte mit einer Emulsion bestehend aus Komplettem Freundeschem Adjuvans (CFA), welches mit hitzeinaktiviertem *Mycobacterium tuberculosis* angereichert wurde (eine Ampulle auf zwei Ampullen CFA), und 4YMBP-Peptid (200µg/50µl PBS) im Verhältnis MBP:CFA = 1:1. Die Injektion von 100µl dieser Emulsion wurde subkutan nahe der Schwanzwurzel gesetzt, außerdem wurden am selben Tag sowie zwei Tage später 250µl Pertussis-Toxin (200ng/250µl PBS) intraperitoneal injiziert.

2.14.2 Beurteilung der EAE

Ab Tag 7 nach MBP-Immunisierung wurden die Versuchstiere täglich im Hinblick auf klinische Krankheitssymptome untersucht, die typischerweise ab Tag 10-14 beobachtet werden konnten. Die Beurteilung erfolgte anhand eines fünfstufigen klinischen EAE-Scores: 0 = keine Symptome; 1 = schlapper Schwanz; 2 = wackelnder Gang; 3 = Lähmung der Hinterläufe; 4 = Lähmung der Vorder-/Hinterläufe; 5 = moribund/tot. Das Scoring erfolgte bis maximal Tag 30 nach Immunisierung.

2.14.3 Autoimmune Hepatitis im Mausmodell

2.14.3.1 Auswertungsstrategie zur Beurteilung des Entzündungsstatus in der Leber

Zur Beurteilung der Schädigung von Lebergewebe diente die Alanin-Aminotransferase (ALT) aus dem Blutserum. Um die Entzündungsvorgänge in der Leber zu bewerten, wurden histologisch die portalen und parenchymatösen Infiltrationen von Entzündungszellen verblindet begutachtet. Darüber hinaus erfolgte die Befundung durch einen Pathologen nach dem modifizierten histologischen Aktivitätsindex mHAI nach Ishak et al. (Ishak et al. 1995). Dieser setzt sich zusammen aus der Beurteilung von Interface Hepatitis (0-4), konfluenter Nekrose (0-4), Einzelzelluntergängen (0-4) und portaler Entzündung (0-4) und erlaubt mit einer Spanne von 0-18 Punkten eine detaillierte Befundung des Ausmaßes der entzündlichen Aktivität. Ferner wurde die relative Zellzahl der Leberlymphozyten erhoben. Für die Histologie erfolgte nach der Leberperfusion die Entnahme von Gewebe für Paraffinschnitte. Die mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitte der Leber wurden verblindet ausgewertet.

2.14.3.2 Serum-Transaminasenmessung

Das Vollblut wurde durch Punktion der *Vena cava inferior* aus den Versuchstieren gewonnen und in ein 1,5ml Auffanggefäß überführt, welches zuvor heparinisiert wurde, um eine

Gerinnung zu verhindern. Pro Maus konnten nach Zentrifugation der Proben (3000rpm, 4°C, 10min) 100-200µl Plasma als Überstand abgenommen werden. Diese wurden bei -80°C gelagert, bis die Bestimmung der Serum-Transaminasen durch das Institut für Klinische Chemie/Zentrallaboratorien am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf erfolgte.

2.14.4 Adoptiver Zelltransfer Antigen-spezifischer CD4+ T-Zellen *in vivo*

Aus Milzen von tg4 Spendertieren wurden wie oben beschrieben CD4+ T-Zellen isoliert, gezählt und in PBS aufgenommen. Der Transfer von $5-10 \times 10^6$ CD4+ T-Zellen (in 150µl PBS) in die Empfängermäuse erfolgte durch intravenöse Injektion in die Schwanzvene. Die Empfängertiere waren am Vortag mit MBP immunisiert worden, um eine EAE bzw. eine Entzündungsreaktion zu induzieren.

Der Oberflächenmarker CD45, von dem zwei funktionell identische Allele (CD45.1 und CD45.2) existieren, erlaubte bei der Analyse eine sichere Identifizierung der Zellen: Die Empfängertiere waren ausschließlich CD45.2-positiv, die Spendertiere dagegen CD45.1-negativ und CD45.2-positiv (Abb.2).

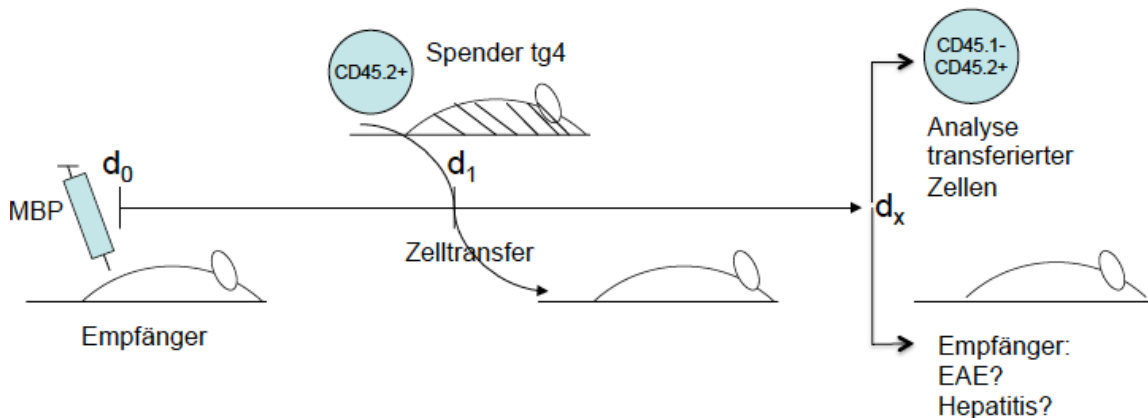


Abb. 2: Schema des adoptiven Zelltransfers.

2.14.5 *In vivo* Treg-Depletion mittels Injektion von anti-mouse-CD25-Antikörper

Für die *in vivo* Depletion von CD4+CD25+Foxp3+ Tregs erhielten die Mäuse zweimal wöchentlich eine intraperitoneale Injektion von 500µg anti-mouse-CD25-Antikörper (PC-61.5.3), der in 200µl PBS gelöst war.

2.14.6 *In vivo* IL-10-Rezeptor-Blockade mittels Injektion von anti-IL-10-Rezeptor-Antikörper

Die *in vivo* Blockade des IL-10-Rezeptors (CD210) in den Versuchstieren erfolgte durch einmal wöchentliche intraperitoneale Injektion von 0,15mg anti-CD210-Antikörper (gelöst in 150µl PBS).

2.14.7 *In vivo* PD-1-Blockade mittels Injektion von anti-mouse-CD279 (PD-1)-Antikörper

Sollte das Programmed Cell Death Protein-1 (PD-1, CD279) *in vivo* blockiert werden, wurden den Versuchstieren zweimal wöchentlich 200µg anti-m-PD-1-Antikörper (RMP1-14), gelöst in 250µl PBS, intraperitoneal injiziert.

2.14.8 *In vivo* CTLA-4-Blockade mittels Injektion von anti-mouse-CTLA-4-Antikörper

Zur *in vivo* Blockade des Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4, CD152) in den Versuchstieren erfolgte zweimal wöchentlich die intraperitoneale Applikation von 100-200µg anti-m-CTLA-4-Antikörper (UC10-4F10-11), welcher in 250µl PBS gelöst wurde.

2.15 Statistische Auswertung

Die graphische und statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad Prism®. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte angegeben und graphisch als Mediane dargestellt. Die Signifikanz wurde, sofern nicht anders angegeben, durch den Mann-Whitney-Test mit einem 95%-Konfidenzintervall getestet und der p-Wert berechnet. Ein p-Wert <0,05 wurde als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des CRP-MBP x tg4 Mausmodells

Die Analysen zur Charakterisierung des CRP-MBP x tg4 Mausmodells wurden von Alena Laschtowitz (Laschtowitz 2018) begonnen und hier fortgesetzt. Gemeinsame Daten werden im Folgenden entsprechend gekennzeichnet.

Es galt, das Vorliegen von MBP-spezifischen reaktiven Zellen im CRP-MBP x tg4 Mausmodell *in vitro* zu bestätigen und um *in vivo* generierte Daten zu erweitern. Auch die Verifizierung von Daten zur erhöhten Frequenz T regulatorischer Zellen sowie der weitgehende Schutz vor einer Autoimmunen Hepatitis (AIH) in Mäusen der Linie CRP-MBP x tg4 sollte durch weitere Versuche erfolgen. Ergänzend wurden Untersuchungen zu spezifischen peripheren Toleranz-Signalwegen durchgeführt; hierbei lag der Fokus auf den TGF- β - und IL-10-Signalwegen.

Die nahezu 100%ige Expression der V β 8.2-Kette, welche für den MBP-spezifischen T-Zell-Rezeptor charakteristisch ist, auf CD4⁺ T-Zellen sowohl in CRP-MBP x tg4 Mäusen als auch in C57BL/6 x tg4 Mäusen konnte in mehreren Versuchen durchflusszytometrisch bestätigt werden (Abb. 3A). Dies ist bemerkenswert, da Lymphozyten, die Autoantigene erkennen, normalerweise während ihres Reifungsprozesses im Thymus klonal deletiert werden. Dieser Prozess soll sicherstellen, dass keine Autoimmunkrankheiten entstehen (S. Sakaguchi & N. Sakaguchi 1990; Kappler et al. 1987).

Es wäre denkbar, dass Lymphozyten der klonalen Deletion entgehen, indem sie den autoreaktiven T-Zell-Rezeptor herunterregeln, also nicht mehr auf ihrer Oberfläche exprimieren. Durch die simultane Färbung von V β 8.2- und TCR β -Kette konnte eine Herunterregulierung nachvollzogen werden. Bei Zellen aus CRP-MBP x tg4 Mäusen war dies nicht der Fall, die MBP-spezifischen T-Zellen blieben unverändert nachweisbar (Abb. 3A).

Zusätzlich zu den Analysen aus der Milz wurden Zellen aus Thymus, Blut und vereinzelt aus Knochenmark gewonnen und analysiert, ergänzend zu Ergebnissen von Alena Laschtowitz (Abb. 3A). Auch hier zeigte sich die konstante V β 8.2-Expression, die Zellen besitzen also das Potential zur MBP-spezifischen Immunantwort (CRP-MBP x tg4 Milz: 99,57%, n=6; Thymus: 98,8%, n=1; Knochenmark: 97,1%, n=1; Blut: 99,72%, n=5 vs. C57BL/6 x tg4 Milz: 98,58%, n=9; Thymus: 94,53%, n=3; Knochenmark: 98,0%, n=1; Blut: 99,75%, n=4; jeweils Mittelwerte).

In Mäusen der Linien CRP-MBP x cd4-DN-IL10R x tg4, deren T-Zellen aufgrund eines dominant-negativen IL-10-Rezeptors auf T-Zellen insensitiv gegenüber IL-10 sind, bzw. in ihren nicht-transgenen Wurfgeschwistern wurde ebenfalls die nahezu 100%ige Expression der V β 8.2-Kette gesehen (C57BL/6 x cd4-DN-IL10R x tg4 Milz: 96,7%, n=11; Thymus: 93,7%, n=2; Blut: 98,7%, n=5; jeweils Mittelwerte) (Abb. 3B). Selbiges trifft für CD4⁺ T-Zellen aus CRP-MBP x hCD2- Δ KT β RII x tg4 Mäusen zu, deren T-Zellen einen dominant-negativen TGF- β -Rezeptor aufweisen (C57BL/6 x hCD2- Δ KT β RII x tg4 Milz: 97,59%, n=7; Thymus: 91,53%, n=4; Blut: 93,87%, n=6; jeweils Mittelwerte) (Abb. 3B). Die genetisch bedingte Einschränkung der TGF- β - bzw. IL-10-Signale scheint also keinen Einfluss auf die Ausbildung des MBP-spezifischen T-Zell-Rezeptors zu haben.

Somit kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die autoreaktiven T-Zellen nicht deletiert werden und das CRP-MBP x tg4 Modell daher für unsere Untersuchungen verwendet werden kann.

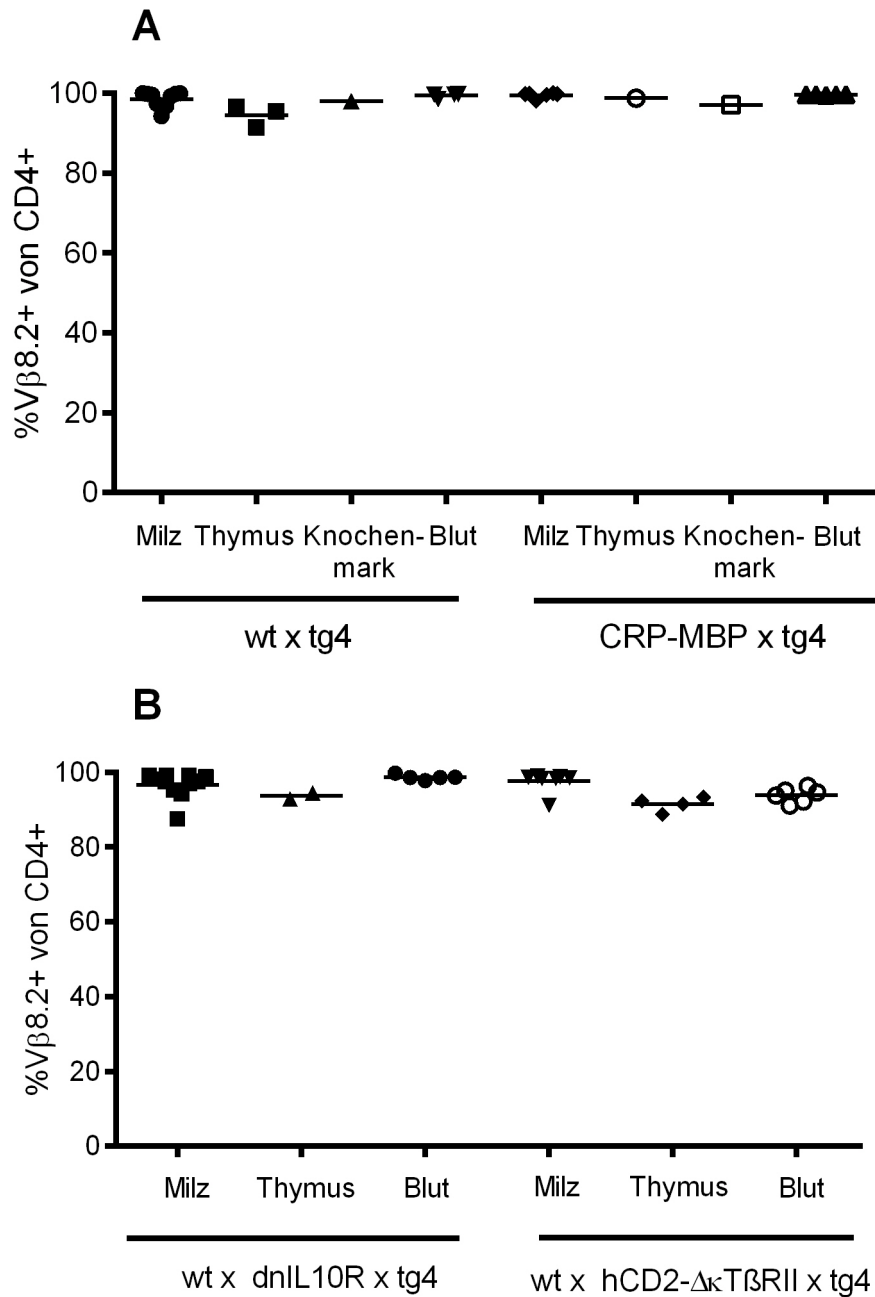


Abb. 3: Expression der Vβ8.2-Kette auf CD4+ T-Zellen unterschiedlicher Organe der Linien CRP-MBP x tg4 und ihrer Wurfgeschwister (A) bzw. wt x cd4-DN-IL10R x tg4 und C57BL/6 x hCD2-ΔκTβRII x tg4 (B). Analyse ohne Vorbehandlung der Tiere.

3.1.1 *In vitro* Funktionalitätsprüfung von Zellen der CRP-MBP x tg4 Linie

Neben der MBP-Spezifität der T-Zellen sollte auch ihre Funktionalität *in vitro* überprüft werden, gemessen an der Fähigkeit nach antigenspezifischer Stimulation inflammatorische Interleukine zu produzieren. Die Funktionalitätsprüfung *in vivo* wird in Abschnitt 3.1.2 thematisiert.

Dazu wurde, in Ergänzung zu Daten aus Vorarbeiten in unserem Labor (Laschtowitz 2018), die Produktion von IFN-γ durch CD4+ T-Effektorzellen nach *in vitro* Stimulation mit dem

Antigen MBP überprüft. Um einen möglichen inhibitorischen Effekt durch vorhandene T regulatorische Zellen (Tregs) nicht zu vernachlässigen, wurden neben Gesamt-CD4+ T-Zellen auch CD4+CD25- Effektor-T-Zellen aus unbehandelten, nicht-immunisierten Tieren isoliert. Je 5×10^5 CD4+CD25- oder CD4+ Zellen wurden zusammen mit 5×10^4 CD11c+ Dendritischen Zellen ausgesät, welche über die Interaktion von CD80/86 mit CD28 ein notwendiges kostimulatorisches Signal zur T-Zell-Aktivierung generieren. Für eine unspezifische Stimulation wurde anti-CD3-Antikörper (2µg/mL) hinzugegeben; für eine MBP-spezifische Stimulation dagegen 50ng/mL MBP Ac1-9 Peptid. Nach 96h Inkubationszeit im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) wurden die Überstände abgenommen und zur ELISA-Zytokinmessung genutzt. Im Überstand der CD4+CD25- T-Effektorzellen waren deutliche Mengen an proinflammatorischem IFN-γ messbar, die nach unspezifischer (CRP-MBP x tg4: 378,1pg/mL vs. wt x tg4: 486,0pg/mL, n= 4 vs. 5, p= 0,0159) und MBP-spezifischer Stimulation (CRP-MBP x tg4: 339,8pg/mL vs. wt x tg4: 429,2pg/mL, n= 5 vs. 7, p= 0,0051) zwar signifikant geringer ausfielen als in der Vergleichsgruppe (Abb. 4A+B), insgesamt jedoch die Stimulierbarkeit von Effektor-T-Zellen aus CRP-MBP x tg4 Mäusen zeigen. Dies wird unterstrichen durch die Messung von IL-17; hierbei zeigte sich eine verstärkte Produktion in den CD4+ T-Zellen der CRP-MBP x tg4 Tiere, sowohl nach unspezifischer (CRP-MBP x tg4: 776,2pg/mL vs. wt x tg4: 522,1pg/mL, n= 4, p= 0,0571) als auch, statistisch signifikant, nach antigenspezifischer Restimulation (CRP-MBP x tg4: 371,0pg/mL vs. wt x tg4: 191,0pg/mL, n= 5 vs. 7, p= 0,0025; Abb. 4C+D). Zusammengefasst lässt sich die *in vitro* Stimulierbarkeit von Effektor-T-Zellen aus diesem Mausmodell feststellen.

Der Vergleich der Zytokinproduktion von CD4+-Gesamt- mit CD4+CD25- Effektor-T-Zellen ließ einen inhibitorischen Einfluss von Tregs auf die proinflammatorische Zytokinantwort erkennen. Nach antigenspezifischer Restimulation konnte eine Tendenz zu größeren Zytokinmengen in den Ansätzen mit CD4+CD25- T-Effektorzellen gemessen werden als in der Vergleichsgruppe mit CD4+ T-Zellen, auch wenn der Unterschied nicht immer signifikant ausfiel. Dieser Effekt wurde sowohl in Zellen aus CRP-MBP x tg4 Mäusen bzgl. IFN-γ (CD4+CD25-: 339,8pg/mL vs. CD4+: 299,6pg/mL, n= 5 vs. 8, p= 0.0932) und IL-17 (CD4+CD25-: 371,0pg/mL vs. CD4+: 348,4pg/mL, n= 5 vs. 8, p= 0.6216) gesehen als auch in Zellen der Linie C57BL/6 x tg4 bei IFN-γ (CD4+CD25-: 429,2pg/mL vs. CD4+: 395,8pg/mL, n= 7 vs. 9, p= 0.1738) und statistisch signifikant bei IL-17 (CD4+CD25-: 191,0pg/mL vs. CD4+: 155,6pg/mL, n= 7 vs. 9, p= 0.0002; keine Abbildung). Weitere Versuche sollten aufgrund teils schwankender Ergebnisse zur Bestätigung dieser Beobachtung unternommen werden. Die Erhöhung der Frequenz von MBP-spezifischen CD4+CD25+Foxp3+ Tregs in MBP-transgenen Tieren im Vergleich zu nicht-transgenen Wurfgeschwistern wurde in multiplen Versuchen festgestellt, soll hier allerdings nicht weiter thematisiert werden, da sie bereits wiederholt in Vorarbeiten gezeigt wurde (Lüth et al. 2008).

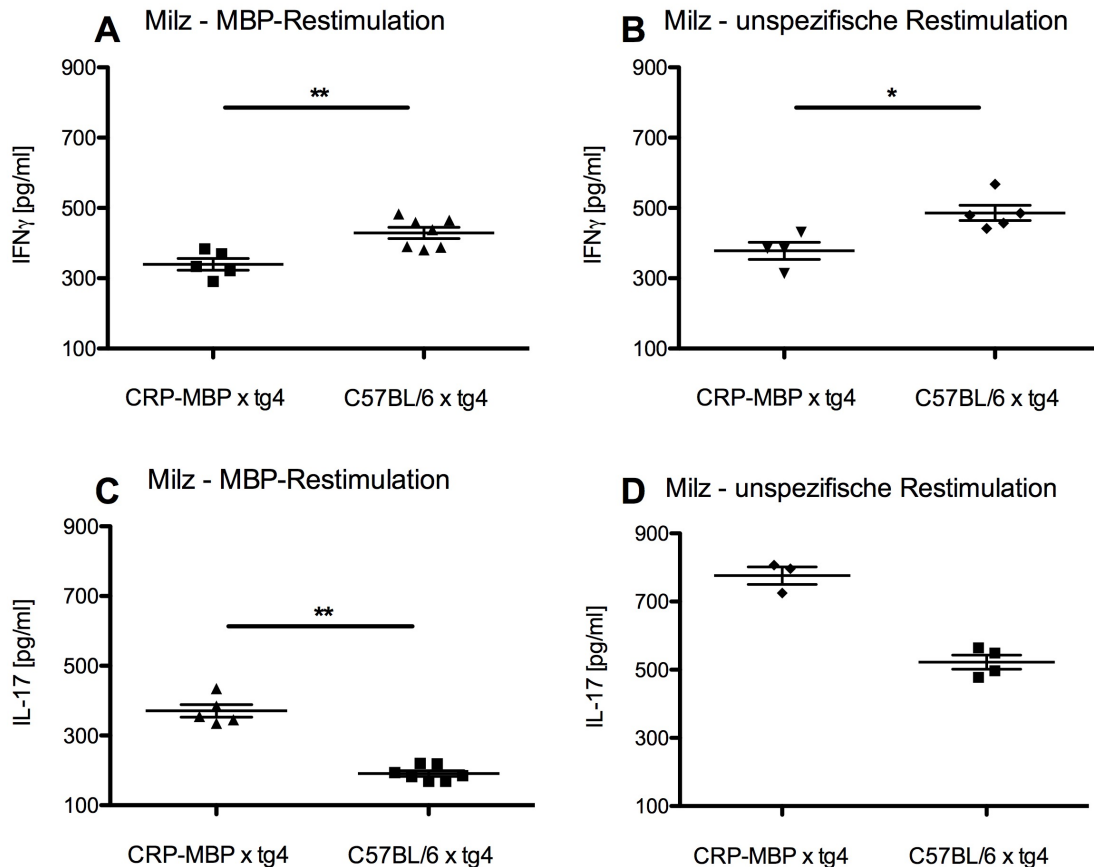


Abb. 4: IFN- γ und IL-17 im Zellkulturüberstand von 5×10^5 CD4+CD25- T-Zellen aus der Milz nach 96h Restimulation in Anwesenheit von 5×10^4 DCs. A+C: MBP-Restimulation (50ng/mL MBP) B+D: unspezifische Restimulation (2 μ g/mL α CD3 AK).

3.1.2 *In vivo* Funktionalitätsprüfung von Zellen der CRP-MBP x tg4 Linie

Ausgehend von den erhobenen Daten zur MBP-Spezifität von CD4+ T-Zellen aus CRP-MBP x tg4 Mäusen, die sich *in vitro* eindeutig stimulierbar zeigten, sollte der Beweis ihrer spezifischen Reaktivität auch *in vivo* erbracht werden. Die Auslösung bzw. Verlauf einer EAE als CD4+ T-Zell-abhängiges Geschehen erschien als geeigneter Parameter zur Beurteilung der Pathogenität. Hierfür wurde das Modell des adoptiven Zelltransfers (s. 2.14.4, Abb. 2) gewählt, bei dem MBP-spezifische CD4+ T-Zellen aus CRP-MBP x tg4 Mäusen intravenös in Empfängerermäuse eingebracht werden, die selbst keine transgenen MBP-spezifischen Zellen besitzen. Sofern die antigenspezifischen Zellen auch *in vivo* ihr reaktives Potential entfalten, sollten ein früherer Beginn der EAE sowie ein aggravierter Krankheitsverlauf zu erwarten sein, da MBP-spezifische CD4+ T-Zellen nach der Immunisierung nicht erst generiert und expandiert werden müssen, sondern bereits im Organismus vorliegen. Ein Transfer von protektiven MBP-spezifischen Tregs wurde dabei weitestgehend ausgeschlossen, da ausschließlich CD4+CD25- Effektor-T-Zellen isoliert wurden (Abb. 5).

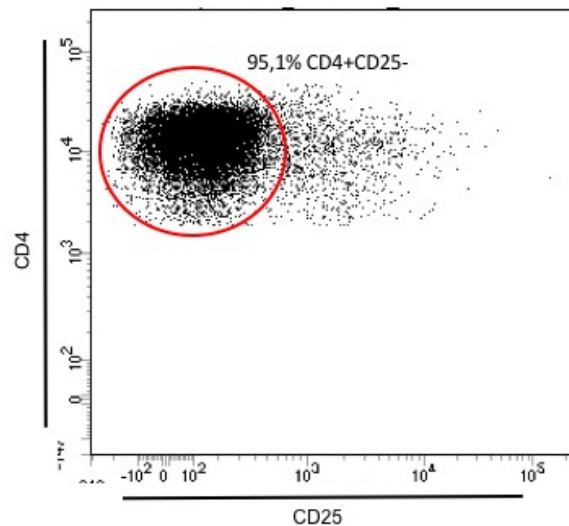


Abb. 5: Exemplarischer Dot Plot der aufgereinigten Population von CD4+CD25- tg4 T-Effektorzellen aus der Milz von CRP-MBP x tg4 Mäusen für den adoptiven Transfer in nicht MBP-transgene C57BL/6 x B10.PL Tiere. Die Reinheit betrug >95%.

Einen Tag nach Immunisierung der C57BL/6 x B10.PL F1 Empfänger-Tiere mit MBP-Peptid und CFA erfolgte der adoptive Zelltransfer von 6×10^6 CD4+CD25- T-Zellen aus CRP-MBP x tg4 Mäusen. Einer Kontrollgruppe wurden 150 μ l PBS in die Schwanzvene injiziert, einer weiteren wt x tg4 CD4+CD25- T-Effektorzellen, um das pathogene Potential abschätzen zu können. Im Folgenden wurde der klinische EAE-Score täglich erhoben (s. 2.14.2).

Tatsächlich zeigten die Mäuse, die CRP-MBP x tg4 Zellen erhalten hatten, erste EAE-Symptome bereits ab Tag 9 nach Immunisierung, passend zum Symptombeginn an Tag 8 bei Transfer der wt x tg4 Zellen. Bei der Kontrollgruppe mit PBS hingegen, welche einen typischen Krankheitsverlauf aufwies, war dies erst an Tag 13 der Fall. Auch die Entwicklung der klinischen Symptome verlief bei den Zelltransfer-Gruppen beschleunigt mit einem insgesamt deutlich höheren EAE-Score (maximaler EAE-Score CRP-MBP x tg4: $2,75 \pm 0,112$ vs. wt x tg4: $3,1 \pm 0,51$ vs. PBS: $1,8 \pm 0,464$, n= 6 vs. 6 vs. 5), dessen Maximum früher (CRP-MBP x tg4: Tag 15 vs. wt x tg4: Tag 16/17 vs. PBS: Tag 20, n= 6 vs. 6 vs. 5) erreicht wurde (Abb. 6, Tab. 1). Folgerichtig fällt auch der mittlere EAE-Score über die gesamte Versuchszeit hinweg betrachtet wesentlich höher aus als in der PBS-Kontrollgruppe (CRP-MBP x tg4 : $1,719 \pm 0,1559$ vs. wt x tg4: $2,497 \pm 0,1666$ vs. PBS: $1,004 \pm 0,1363$) und unterschied sich signifikant zwischen den Gruppen (1way ANOVA: $P \leq 0,0001$).

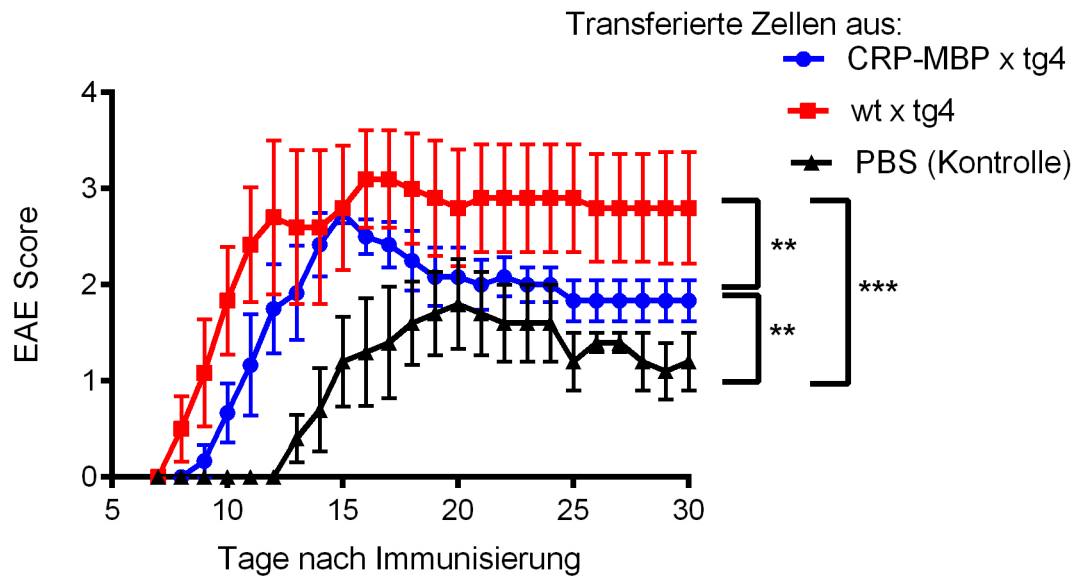


Abb. 6: EAE-Verlauf von C57BL/6 x B10.PL Mäusen nach MBP-Immunisierung und adoptivem Transfer von 6×10^6 CD4+CD25- T-Effektorzellen aus der CRP-MBP x tg4 oder wt x tg4 Linie; Injektion von PBS i.v. als Kontrolle.

Zusammen mit den *in vitro* Ergebnissen kann dieser Versuch als *in vivo* Bestätigung des pathogenen Potentials von CD4+ T-Effektorzellen aus Mäusen der Linie CRP-MBP x tg4 betrachtet werden.

Tab. 1: Kennwerte des EAE-Verlaufes von C57BL/6 x B10.PL Mäusen nach MBP-Immunisierung und adoptivem Transfer von 6×10^6 CD4+CD25- T-Effektorzellen aus der CRP-MBP x tg4 (A) oder C57BL/6 x tg4 Linie (B); Injektion von PBS i.v. als Kontrolle (C).

	A CRP-MBP x tg4 T _{eff}	B C57BL/6 x tg4 T _{eff}	C PBS (Kontrolle)
Gruppengröße n	6	6	5
Tag des Auftretens erster Symptome	9	8	13
Tag der maximalen Symptomausprägung	15	16 und 17	20
maximaler EAE-Score ± SEM	2,75 ± 0,112	3,1 ± 0,51	1,8 ± 0,464
mittlerer EAE-Score ± SEM (über die Versuchsdauer von d ₇ -d ₃₀)	1,719 ± 0,1559	2,497 ± 0,1666	1,004 ± 0,1363
Signifikanzniveau (1way-ANOVA Test mit 95% Konfidenzintervall der Differenzen)	CRP-MBP x tg4 T _{eff} vs C57BL/6 x tg4 T _{eff} : ** (-1,299 bis -0,2579) CRP-MBP x tg4 T _{eff} vs PBS (Kontrolle): ** (0,1940 bis 1,235) C57BL/6 x tg4 T _{eff} vs PBS (Kontrolle): *** (0,9725 bis 2,014)		

Eine Wiederholung des Versuches ist geplant, insbesondere um zu überprüfen, ob T-Effektorzellen aus CRP-MBP x tg4 Mäusen tatsächlich ein etwas geringeres pathogenes Potential aufweisen als T-Effektorzellen aus ihren nicht-transgenen Wurfgeschwistern, was sich in den vorliegenden Daten mit dem stärksten Krankheitsverlauf anzudeuten scheint. Dies wäre gegebenenfalls auch eine mögliche Erklärung für die insgesamt höhere IFN- γ -Produktion der Zellen aus wt x tg4 Tieren nach *in vitro* Stimulation (s. Abb. 4A). Bei einem Wiederholungsversuch könnten des Weiteren nicht-MBP-spezifische CD4⁺ T-Effektorzellen transferiert werden zur Beweisführung, dass die beobachtete frühe, schwere Krankheitsauslösung von der MBP-Spezifität abhängt, nicht aber bei jeglichem Transfer unspezifischer CD4⁺T-Zellen auftritt. Dass CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus CRP-MBP x tg4 Tieren auch *in vivo* reaktiv sowie in der Lage sind, eine EAE auszulösen, darf anhand der gezeigten Daten jedoch als gesichert betrachtet werden.

3.1.3 Bedeutung von hepatisch induzierten T regulatorischen Zellen für die periphere Toleranz

Das protektive Potential von in der Leber induzierten, antigenspezifischen CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs konnte bereits 2008 durch Lüth et al. beschrieben werden, als der adoptive Transfer von CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs aus CRP-MBP transgenen Mäusen in susceptible Wildtyp-Mäuse Schutz vor dem Auftreten einer EAE brachte. Des Weiteren zeigten sie, dass diese Foxp3⁺ Tregs in CRP-MBP transgenen Mäusen in der Peripherie aus konventionellen non-Treg CD4⁺CD25⁻ T-Zellen induziert wurden. In einer weiteren Studie wurde beschrieben, dass insbesondere LSECs für die hepatische Treg-Induktion verantwortlich zu sein scheinen, was unter dem notwendigen Einfluss von TGF- β geschieht (Carambia et al. 2014), und dass eine höhere Foxp3⁺ Treg-Frequenz in CRP-MBP x tg4 Mäusen beobachtet werden konnte (Laschtowitz 2018). Vor diesem Hintergrund sollte nun überprüft werden, ob die Depletion von Tregs hinreichend ist, um die hepatisch induzierte Toleranz in CRP-MBP x tg4 Mäusen zu durchbrechen. Da sich Foxp3 als intrazellulärer Transkriptionsfaktor nicht zur selektiven Depletion anbot, wurde mit dem gegen die α -Kette des IL-2-Rezeptors gerichteten anti-CD25-Antikörper (Klon: PC61.5.3) gearbeitet. Beginnend ab Tag 2 nach der Immunisierung mit MBP/CFA erhielten die Mäuse zweimal wöchentlich eine intraperitoneale Injektion von 500 μ g PC61.5.3, um die Tregs funktionell weitgehend auszuschalten. Der Erfolg der Behandlung wurde nach Versuchsende an Tag 30 durchflusszytometrisch kontrolliert; der Anteil an Foxp3⁺CD25⁺ Tregs an allen CD4⁺ T-Zellen lag in den AK-behandelten Tieren mit 1,586% signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe, wo 11,38% Tregs beobachtet wurden (CRP-MBP x tg4 + PC61.5.3: 1,586 $\pm$ 0,7777%; CRP-MBP x tg4 + Isotyp-Kontrolle: 11,38 $\pm$ 1,710%; n= 7; p=00021; Abb. 7).

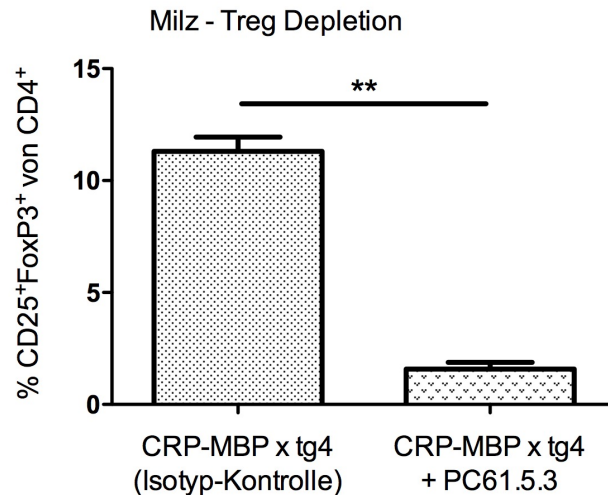


Abb. 7: Anteil der Population von CD25⁺Foxp3⁺ Tregs an CD4⁺ T-Zellen in der Milz von CRP-MBP x tg4 Mäusen nach zweimal wöchentlicher Gabe von 500µg PC61.5.3-AK i.p. Die Kontrollgruppe erhielt den Isotyp des Antikörpers. Analyse an Tag 30 nach MBP-Immunisierung.

Der erfolgreichen Treg-Depletion zum Trotz kam es in den CRP-MBP x tg4 Mäusen nicht zum Ausbruch der Krankheit bzw. zum Auftreten von EAE-Symptomen (keine Abbildung), die peripher induzierte Toleranz blieb erhalten. Passend dazu und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Alena Laschtowitz (Laschtowitz 2018) konnten histologisch in den HE-Schnitten der Lebern keine oder lediglich vereinzelt portalfeldnahe Infiltrate gefunden werden (Abb. 8B). Bei ebenfalls nur marginal erhöhten Werten der Serum-Transaminase ALT (Abb. 8A) liegt daher auch keine ausgeprägte autoimmune Hepatitis vor.

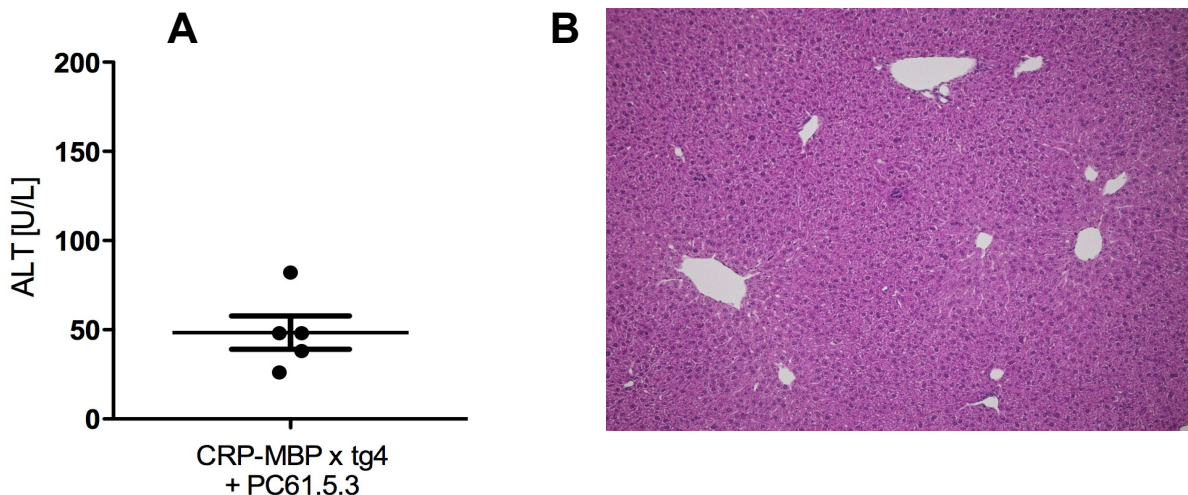


Abb. 8: Werte der Alanin-Aminotransferasen (A) und HE-Schnitt der Leber in 10-facher Vergrößerung (B) von mit PC61.5.3-AK behandelten CRP-MBP x tg4 Mäusen an Tag 30 nach MBP-Immunisierung.

Eine Wiederholung des Versuches, bei dem die Analyse zu einem früheren Zeitpunkt an Tag 7 nach Immunisierung erfolgte, wurde durchgeführt, um ein mögliches passageres inflammatorisches Geschehen nicht zu übersehen. Dabei bestätigte sich die beobachtete Wirkung der Treg-Depletion eindrucklich: sowohl bei MBP-transgenen Mäusen als auch in der nicht-transgenen Kontrollgruppe fanden sich nach Anwendung des Antikörpers nur

marginale Werte von CD25+Foxp3+ Tregs (CRP-MBP x tg4 + PC61.5.3: $0,4250 \pm 0,3948\%$; C57BL/6 x tg4 + PC61.5.3: $0,3750 \pm 0,3096\%$; $n = 4$; $p = 1,0$), im Gegensatz zu den Kontrollgruppen ohne Antikörper-Behandlung (CRP-MBP x tg4 - PC61.5.3: $18,17 \pm 1,955\%$; C57BL/6 x tg4 - PC61.5.3: $7,650 \pm 2,082\%$; $n = 3$ vs. 4 ; $p = 0,0571$; Abb. 9A). Der hohe Anteil von CD25+Foxp3+ Tregs in den CRP-MBP x tg4 Mäusen bestätigte nebenbei das bekannte Potential zur Treg-Induktion von Mäusen mit ektopischer MBP-Expression in der Leber (Lüth et al. 2008). Weiterhin ließen sich weder histologisch in der HE-Färbung, die nur vereinzelt Lymphozyteninfiltrate zeigte (keine Abbildung), noch hinsichtlich der Serum-Transaminasen signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen mit Treg-Depletion (CRP-MBP x tg4 - PC61.5.3: $49,87 \pm 5,139$ U/L; C57BL/6 x tg4 - PC61.5.3: $46,95 \pm 23,69$ U/L; $n = 4$; $p = 0,3429$) oder ohne finden (CRP-MBP x tg4 - PC61.5.3: $97,71 \pm 48,36$ U/L; C57BL/6 x tg4 - PC61.5.3: $35,85 \pm 4,298$ U/L; $n = 3$ vs. 4 ; $p = 0,0571$; Abb. 9B). Die moderat, jedoch nicht signifikant erhöhten Werte der Serum-Transaminasen in MBP-transgenen Mäusen nach MBP-Immunisierung im Vergleich zu ihren nicht transgenen Wurfgeschwistern decken sich mit Beobachtungen aus Versuchen von Alena Laschtowitz (Laschtowitz 2018). Insgesamt lag somit keine fulminante autoimmune Hepatitis vor.

Die vorliegenden Daten dürfen daher als starker Hinweis darauf gewertet werden, dass CRP-MBP x tg4 Mäuse auch nach Depletion von protektiven CD25+Foxp3+ Tregs nicht suszeptibel für eine autoimmune Neuroinflammation sind.

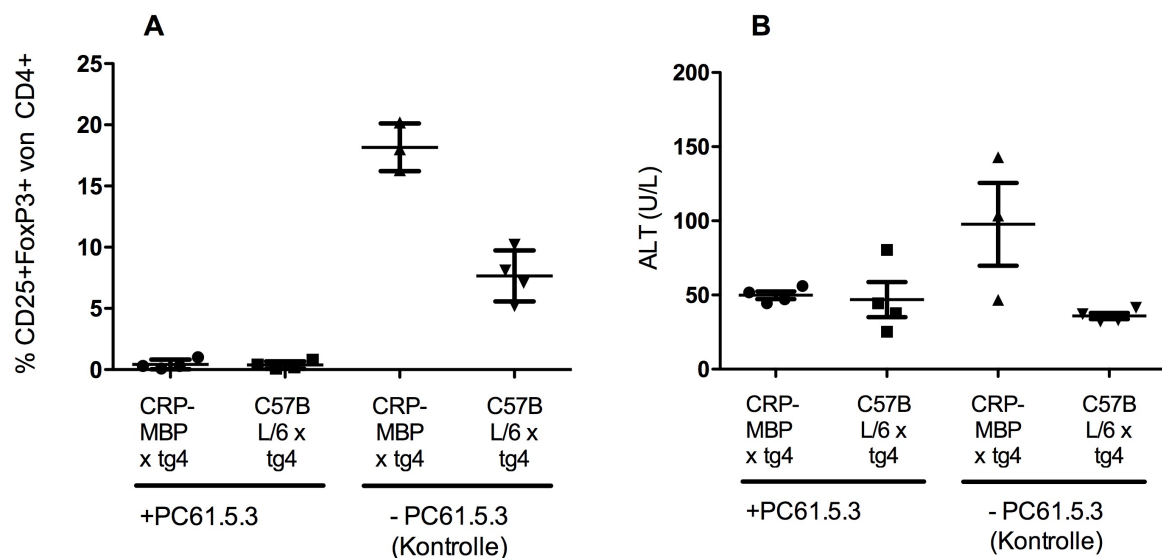


Abb. 9: CD25+Foxp3+ Treg-Populationen in CRP-MBP x tg4 und C57BL/6 x tg4 Mäusen mit und ohne PC61.5.3-Antikörperbehandlung (A) sowie die Werte der Alanin-Aminotransferase (ALT) (B). Die Analyse erfolgte an Tag 7 nach MBP-Immunisierung.

MBP-spezifische CD25+Foxp3+ Tregs liegen also in CRP-MBP x tg4 Mäusen in gesteigerter Frequenz vor (Lüth et al. 2008) und können bei adoptivem Transfer in nicht-transgene Empfänger einen Schutz vor EAE übertragen. Gleichwohl sind sie für die Aufrechterhaltung der Toleranz entbehrlich. Dies sollte in einer weiteren Herangehensweise überprüft werden, für die CRP-MBP x hCD2- Δ KT β R II x tg4 Tiere verwendet wurden. Neben der hepatischen MBP-Expression und dem MBP-spezifischen T-Zell-Rezeptor, der gemessen an der V β 8.2-Expression auf allen CD4+ T-Zellen exprimiert wird (s. Abb. 3B, S.35), tragen Mäuse dieser Linie einen dominant-negativen TGF- β -II-Rezeptor (hCD2- Δ KT β R II), sodass ihre T-Zellen TGF- β -insensitiv sind. Dieser Defekt führt zu der Unfähigkeit, periphere iTregs zu generieren, da dies ein TGF- β -abhängiger Prozess ist (Lüth et al. 2008; Carambia et al. 2014). Die

nicht TGF- β -abhängige Reifung von im Thymus gebildeten natürlichen Tregs bleibt dagegen auch in CRP-MBP x hCD2- $\Delta\kappa$ T β R II x tg4 Mäusen unbeeinflusst.

Sollten iTregs für die Aufrechterhaltung der Toleranz wirklich abkömmlich sein, so dürften Mäuse der Linie CRP-MBP x hCD2- $\Delta\kappa$ T β R II x tg4 nach Immunisierung mit dem Autoantigen MBP für eine Krankheitsauslösung nicht suszeptibel sein. Tatsächlich entwickelten die Mäuse nach MBP-Immunisierung keinerlei Symptome einer EAE (Abb. 10A) oder einer hepatischen Entzündung, gemessen an den Werten der Alanin-Aminotransferase an Tag 7 (Abb. 10B) sowie Tag 30 (keine Abbildung), die unauffällig bzw. nur marginal erhöht waren.

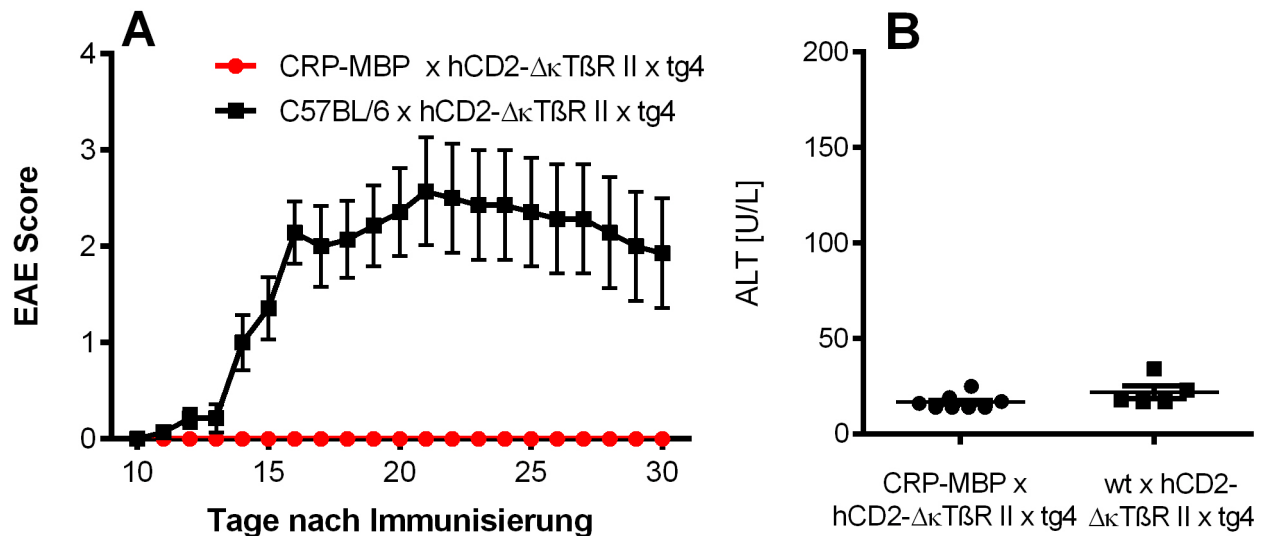


Abb. 10: EAE-Verlauf (A) von CRP-MBP x hCD2- $\Delta\kappa$ T β R II x tg4 Mäusen nach Immunisierung mit MBP. Als Kontrolle dienten nicht-MBP-transgene Wurfgeschwister (C57BL6 x hCD2- $\Delta\kappa$ T β R II x tg4). (B) zeigt die in beiden Gruppen nicht signifikant erhöhten Werte der Serum-Alanin-Aminotransferase an Tag 7 nach MBP-Immunisierung.

Auch die histologische Analyse blieb an Tag 7 (Abb. 11A) sowie an Tag 30 (Abb. 11B) ohne Hinweise auf ein starkes inflammatorisches Geschehen; lediglich vereinzelte entzündliche Infiltrate wurden gefunden. Übereinstimmend damit lag die Zahl der Leberlymphozyten mit ca. 3,5 Millionen pro Gramm Gewebe im normalen Bereich ohne Unterschied zu der Kontrollgruppe (CRP-MBP x hCD2- $\Delta\kappa$ T β R II x tg4: $3,3 \times 10^6$ /g vs. wt x hCD2- $\Delta\kappa$ T β R II x tg4: $3,9 \times 10^6$ /g, n= 8 vs. 5, p= 0,5237). Alle Beobachtungen konnten in Wiederholungsversuchen bestätigt werden. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass eine selektive Beeinträchtigung der Treg-Generierung bzw. des TGF- β -Signalweges keine hinreichende Maßnahme zur Durchbrechung der hepatisch induzierten Toleranz darstellt.

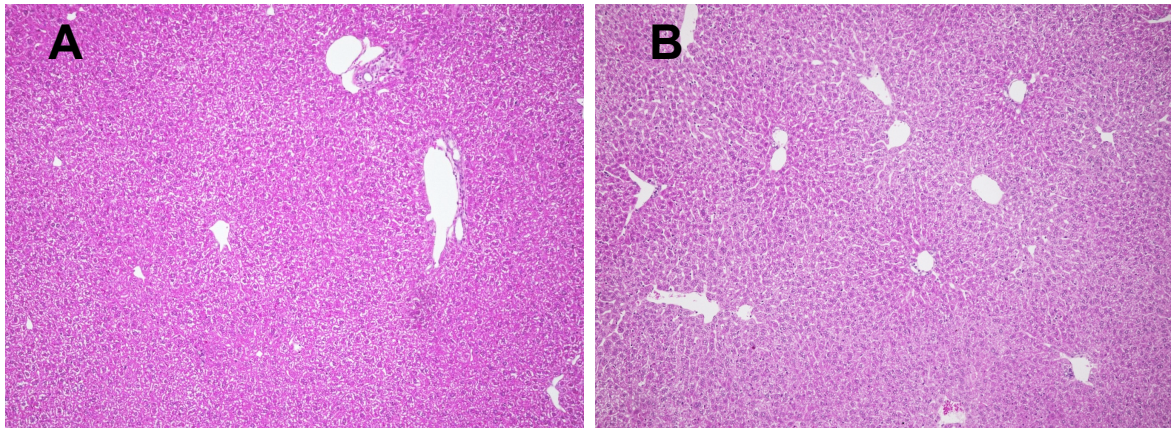


Abb. 11: HE-Schnitte aus der Leber von CRP-MBP x hCD2- Δ kT β R II x tg4 Mäusen an Tag 7 (A) und Tag 30 (B) nach MBP-Immunisierung in 10-facher Vergrößerung.

3.2 Charakterisierung von tg4 Zellen nach adoptivem Zelltransfer in CRP-MBP x B10.PL Mäuse

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass tg4 T-Zellen *in vitro* und *in vivo* reaktiv sind bzw. pathogenes Potential entfalten (s. 3.1.1 und 3.1.2). Trotzdem führt das Vorkommen MBP-spezifischer Zellen – wie in der Linie CRP-MBP x tg4 oder nach adoptivem Zelltransfer von tg4 Zellen in CRP-MBP x B10.PL Empfänger – nicht zu einer autoimmunen inflammatorischen Reaktion. Dies legt nahe, dass die Antigen-spezifischen Effektorzellen entweder ihren Phänotyp ändern und selbst tolerant werden oder von anderen Zellen inhibiert werden könnten. Der TGF- β -abhängige Signalweg und über ihn induzierte periphere Tregs können zwar eine Toleranz vermitteln, bei ihrer Blockade wird die Toleranz jedoch nicht durchbrochen. Daher sollte überprüft werden, ob möglicherweise ein anderer Typus peripher induzierter T regulatorischer Zellen, sog. Typ 1 T regulatorische Zellen (Tr1), von entscheidender Bedeutung ist. Im Gegensatz zu Tregs sind Tr1 Zellen Foxp3-negativ, eine Identifikation soll über die Koexpression der Oberflächenantigene CD49b und Lag-3 möglich sein (Gagliani et al. 2013). Zur Verfolgung des Zellschicksals wurde das Modell des adoptiven Transfers gewählt (s. Abb. 2, S.32), in dem $5-10 \times 10^6$ CD4⁺ T-Zellen (gelöst in 150 μ l PBS) aus nicht-toleranten Spendern der Linie tg4 in vortags immunisierte Empfänger der Linie CRP-MBP x B10.PL intravenös transferiert wurden. Die vorherige Immunisierung der Empfänger mit MBP/CFA diente der Generierung eines proinflammatorischen Kontextes. Über die congen-Marker CD45.1/CD45.2 gelang bei der durchflusszytometrischen Analyse an Tag 7 eine sichere Zuordnung von Spender- und Empfängerzellen (Abb. 12). So konnte eine mögliche Differenzierung der transferierten reaktiven tg4-Zellen nachvollzogen werden. Außerdem wurden die Empfängermäuse hinsichtlich des Auftretens einer Hepatitis oder EAE als Zeichen einer Inflammation untersucht. Als Vergleichsgruppe wurden die tg4 Zellen in nicht CRP-MBP transgene Wurfgeschwister ohne hepatische MBP-Expression übertragen.

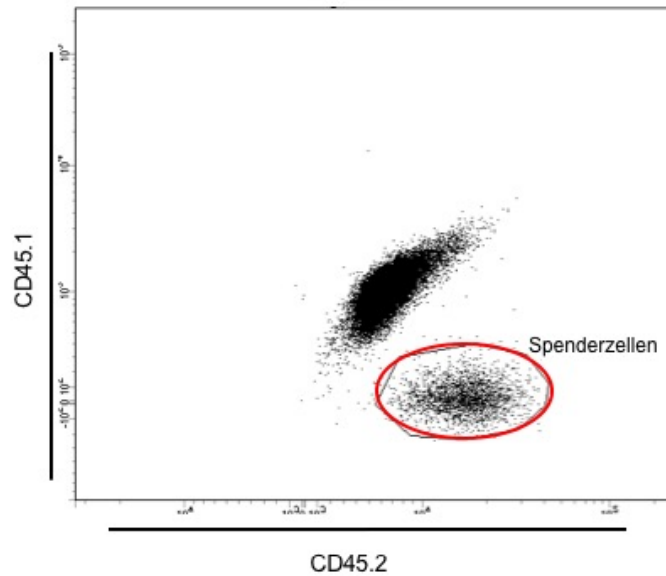


Abb. 12 Exemplarischer Dot Plot der CD45.1-CD45.2+ Zellpopulation der Spendertiere (markiert) und der CD45.1+CD45.2+ Population der Empfänger nach adoptivem Zelltransfer. Vorheriges Gating erfolgte anhand von FSC-H, FSC-A, SSC-A und Paco-NHS. Analyse an Tag 7 nach MBP-Immunisierung und Tag 6 nach Zelltransfer.

3.2.1 Induktion eines Tr1-ähnlichen Phänotyps

Hinweisen auf einen Tr1-ähnlichen Phänotyp im Modell des adoptiven Transfers wurde durch die Messung von Serum-Transaminasen, mit histologischen Färbungen der Leber, Messungen der hepatischen Genexpression sowie mit verschiedenen durchflusszytometrischen Analysen von Zellen aus Milz und Leber nachgegangen, um so die Daten aus Vorarbeiten von Alena Laschtowitz zu bestätigen bzw. zu ergänzen. Zu den standardmäßig an Tag 7 nach Immunisierung durchgeführten Analysen sollte auch zu einem früheren Zeitpunkt der inflammatorische Verlauf beurteilt werden; gewählt wurde hierzu Tag 4 nach Immunisierung, entsprechend dem Tag 3 nach Zelltransfer.

In der Tat wurden die in Vorarbeiten tendenziell moderat erhöhten Werte der Serum-Transaminasen (ALT: CRP-MBP x tg4: 129,0 U/L vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL: 109,3 U/L, n= 6 vs. 6, p= 0,6884; keine Abbildung) sowie histologisch die verstärkten Infiltrate in den Lebern von CRP-MBP x B10.PL Tieren an Tag 7 wiederholt gesehen. Bezüglich der leberinfiltrierenden Lymphozyten konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen beobachtet werden (CRP-MBP x B10.PL: $11,9 \times 10^6/\text{g}$ vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL: $11,4 \times 10^6/\text{g}$; n= 6, p= 0,6991) (Abb. 13A). Diesen Schluss untermauerte die Analyse an Tag 4, bei annähernd gleichen Werten zwischen den Gruppen mit insgesamt marginal geringerer Leberlymphozytenanzahl (CRP-MBP x B10.PL: $11,7 \times 10^6/\text{g}$ vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL: $10,2 \times 10^6/\text{g}$; n= 5, p= 0,6004; keine Abbildung). Hierzu würden die histologisch an Tag 4 gesehenen, lediglich gering ausgeprägten, portalfeldnahen Infiltrate in den Lebern ohne Nekrosen passen, bei denen kein Unterschied zur Kontrollgruppe bestand. Andererseits wurden bei der frühen Analyse erhöhte Serum-Transaminasen gemessen (CRP-MBP x B10.PL: 151,2 U/L vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL: 201,2 U/L; n= 5, p= 0,1732), die auf ein entzündliches Geschehen hindeuten. Es bestand kein Unterschied zur Kontrollgruppe. Da allerdings die Werte innerhalb der Gruppen bei der Analyse an Tag 4 stark schwankten und

somit insgesamt z.T. widersprüchliche Ergebnisse nahelegten, sollte dieser Versuch wiederholt werden, um eine valide Aussage treffen zu können.

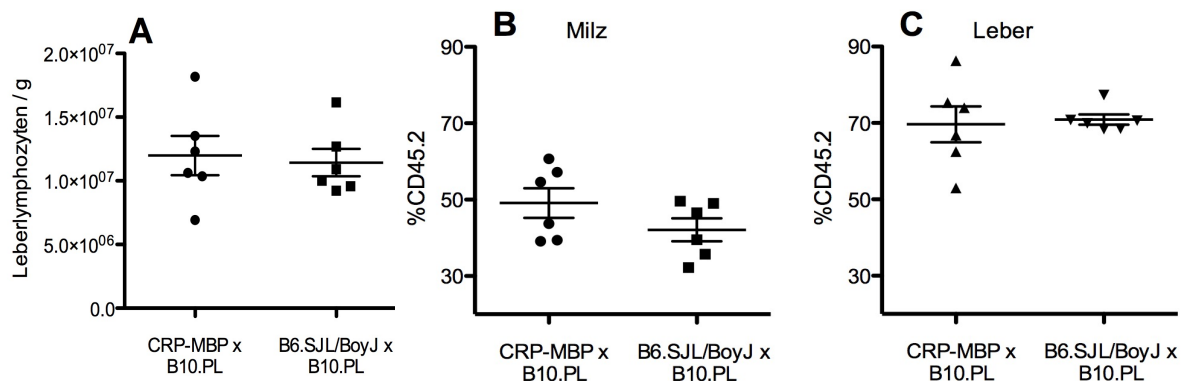


Abb. 13: (A) Anzahl der Leberlymphozyten pro Gramm Lebergewebe von CRP-MBP x B10.PL Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe B6.SJL/BoyJ x B10.PL sowie Anteil der CD45.2+ Zellen der tg4 Spendertiere an allen isolierten Lymphozyten in Milz (B) und Leber (C) der Empfänger. Analyse an Tag 7 nach MBP-Immunisierung und Tag 6 nach Zelltransfer.

In der durchflusszytometrischen Analyse an Tag 7 zeigte sich, dass die CD45.2+ Lymphozyten in der Leber die Mehrheit der isolierten NPCs ausmachten (CRP-MBP x B10.PL: 69,65% vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL: 70,92%; n= 6, p= 0,8182; Abb. 13C), die Milz dagegen weniger stark infiltrierten (CRP-MBP x B10.PL: 49,12% vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL: 42,10%; n= 6, p= 0,3095; Abb. 13B), wo sie nahezu die Hälfte der isolierten Lymphozyten darstellten, was sich mit Beobachtungen von Alena Laschtowitz deckt (Laschtowitz 2018).

Es wurde außerdem untersucht, ob sich die Vermutung, dass sich unter den Lymphozyten in der Leber verstärkt die transferierten CD4+ T-Zellen in den transgenen CRP-MBP x B10.PL Mäusen befinden, bestätigen ließ. Tatsächlich konnte in der Leber eine signifikant gesteigerte Frequenz von CD45.1-CD45.2+CD4+ T-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden (CRP-MBP x B10.PL: 18,22% vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL: 15,77%; n= 6, p= 0,045; Abb. 14B). In der ebenfalls untersuchten Milz zeigte sich zwar eine entsprechende Tendenz, jedoch ohne signifikanten Unterschied (CRP-MBP x B10.PL: 17,4% vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL: 15,55%; n= 6, p= 0,0777; Abb. 14A). Interessanterweise lagen die Anteile der transferierten CD4+ T-Zellen an den untersuchten CD45+ Lymphozyten dabei in beiden Organen auf demselben Niveau. Insgesamt kann somit argumentiert werden, dass die beobachtete Lymphozyteninfiltration bei CRP-MBP x B10.PL Mäusen verstärkt CD4+ T-Zell-getrieben ist, im Gegensatz zur nicht-transgenen Vergleichsgruppe. Die Anwesenheit des MBP-Antigens in der Leber dieser Tiere, welche die Rekrutierung der antigenspezifischen Zellen in die Leber begünstigt, liefert eine plausible Erklärung für diese Beobachtung.

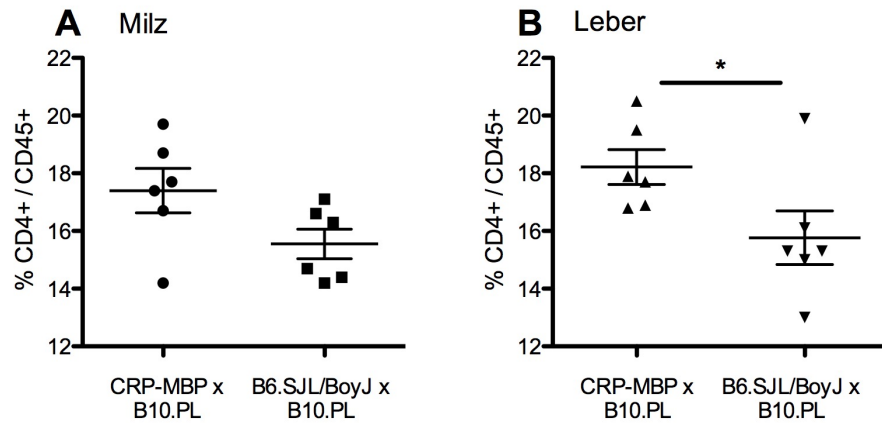


Abb. 14: Anteil der transferierten CD45.1-CD45.2+CD4+ T-Zellen an CD45+ Lymphozyten in der Milz (A) und Leber (B) von CRP-MBP x B10.PL Mäusen an Tag 7 nach MBP-Immunisierung und Tag 6 nach Zelltransfer. Als Kontrolle dienten B6.SJL/BoyJ x B10.PL Mäuse.

Die Identifizierung von Tr1 Zellen erfolgte über die Koexpression der Oberflächenmoleküle CD49b und Lag-3 bei gleichzeitiger Foxp3-Negativität der transferierten MBP-spezifischen CD4+ T-Zellen (Abb. 15).

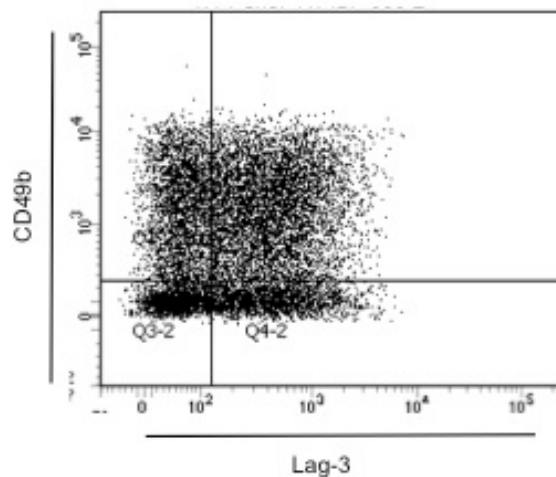


Abb. 15: Exemplarischer Dot Plot des CD49b+Lag-3+ Tr1-Phänotyps (hier: 44,2% Tr1 von CD4+Foxp3- Zellen der tg4 Spendertiere) in der Leber von CRP-MBP x B10.PL Mäusen. Analyse an Tag 7 nach MBP-Immunisierung und Tag 6 nach Zelltransfer.

In mehreren Versuchen konnte das erhöhte Vorkommen von CD4+Foxp3-CD49b+Lag-3+ Zellen, des Tr1-Phänotyps, in der Leber von CRP-MBP x B10.PL Mäusen, wie von Alena Laschtowitz zuvor gezeigt (Laschtowitz 2018), beobachtet werden. Die Anteile von bis zu 30% Tr1 der CD4+Foxp3- Zellen in der Leber mit stets signifikantem Unterschied zur nicht-MBP-transgenen Kontrollgruppe sowie ein höherer Tr1-Anteil in der Milz, auch wenn dieser nicht immer statistisch signifikant ausfiel, konnten bestätigt werden (Abb. 16). Dies traf auch im Vergleich zur Kontrollgruppe der K5-MBP x B10.PL Mäuse zu, die das MBP-Peptid zwar ektopisch in der Haut exprimieren, nicht jedoch in der Leber, und sich daher hinsichtlich des nicht beobachteten Tr1-Phänotyps den nicht-MBP-transgenen B6.SJL/BoyJ x B10.PL Mäusen gleichwertig zeigten (CRP-MBP x B10.PL Milz: 11,82% vs. K5-MBP x B10.PL Milz:

10,55%, n= 5 vs. 4, p= 0,4127; CRP-MBP x B10.PL Leber: 30,22% vs. K5-MBP x B10.PL Leber: 11,75%, n= 5 vs. 4, p= 0,0079; Abb. 16). Die Induktion dieses Tr1 Phänotyps scheint somit obligatorisch von der Expression des MBP in der Leber – und nicht generell in peripheren Organen – abzuhängen.

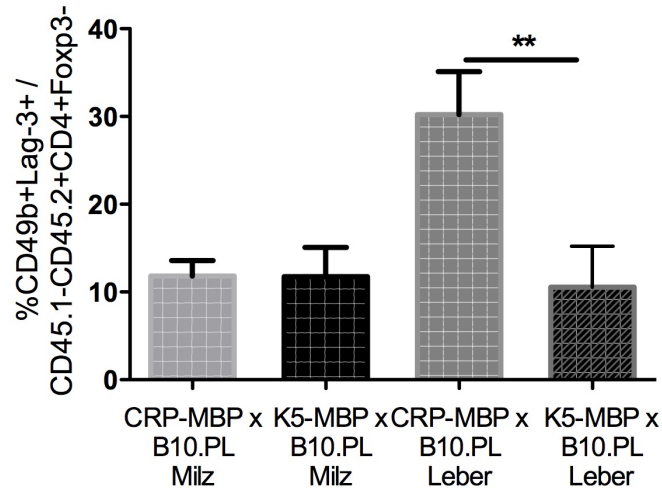


Abb. 16: Anteil von Tr1-phänotypischen Zellen an der CD4+Foxp3- Population der Spendertiere (tg4) in Leber und Milz von CRP-MBP x B10.PL Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (K5-MBP x B10.PL), Analyse an Tag 7 nach MBP-Immunisierung und Tag 6 nach Zelltransfer.

Interessanterweise zeigte sich bei der frühen Analyse an Tag 4 nach Immunisierung und Tag 3 nach Zelltransfer im Auftreten von CD49b+Lag-3+ Zellen (Abb. 17) noch kein Unterschied zwischen den Gruppen (CRP-MBP x B10.PL Milz: 4,64% vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL Milz: 3,88%; n= 5, p= 0,2948; CRP-MBP x B10.PL Leber: 9,72% vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL Leber: 8,78%; n= 5, p= 0,6905). Auffällig ist hier das niedrige Niveau der Tr1-Anteile von ca. 4% in der Milz und annähernd 10% in der Leber im Vergleich zu den Werten von ca. 12% (Milz) bzw. 30% (Leber) in CRP-MBP x B10.PL Mäusen bei Analysen an Tag 7. Wahrscheinlich erfolgt die Wandlung des Phänotyps bzw. die veränderte Expression der Oberflächenmarker in CRP-MBP x B10.PL Mäusen sukzessive nach Transfer der tg4 Zellen, sodass davon auszugehen ist, dass Tag 4 nach Immunisierung zur Analyse von Tr1-phänotypischen Zellen zu früh gewählt ist. Daraus kann wohl der Schluss gezogen werden, dass sich der Anteil an CD49b+Lag-3+ Zellen kontinuierlich steigert, bis nach einer Woche der höchste Anteil erreicht wird; 15 Tage nach Immunisierung sind dagegen keine Zellen der Spendertiere mehr auffindbar (Daten aus Vorversuchen, *unveröffentlicht*).

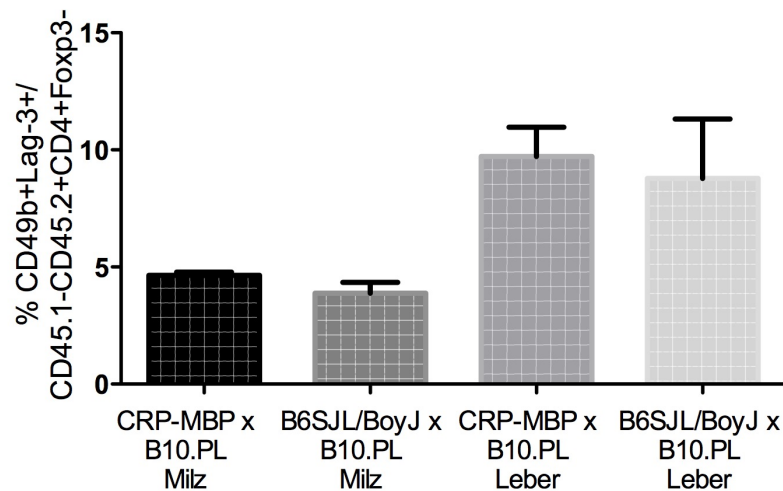


Abb. 17: Anteil von Tr1-phänotypischen Zellen an der CD4+Foxp3- Population der Spendertiere (tg4) in Milz und Leber von CRP-MBP x B10.PL Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (B6.SJL/BoyJ x B10.PL). Analyse an Tag 4 nach MBP-Immunisierung und Tag 3 nach Zelltransfer.

3.2.2 Genexpressionsanalysen im Zusammenhang mit dem Tr1-Phänotyp

Zusätzlich zu den oben genannten Analysen wurde die hepatische Genexpression mittels rt-qPCR untersucht. Dabei wurde der Fokus auf Gene gelegt, die in der Literatur im Zusammenhang mit IL-10- bzw. Tr1-Induktion beschrieben wurden, sodass eine möglicherweise verstärkte Induktion dieser Gene plausibel erschien. Es handelte sich um IL-6 als proinflammatorisches und IL-10 als antiinflammatorisches Interleukin sowie das die Aktivität von T-Lymphozyten regulierende IL-27 mit seinen zwei Untereinheiten eBi3 und p28, die über den Transkriptionsfaktor c-Maf Einfluss auf die IL-10-/Tr1-Induktion nehmen (Pot et al. 2009; Pflanz et al. 2002). Des Weiteren wurde die Expression des Transkriptionsfaktors Ahr untersucht, der je nach Ligand inflammatorisch oder suppressiv wirken kann, und auch bei der Induktion von Tregs und Tr1 Zellen (zusammen mit c-Maf) beteiligt ist (Apetoh et al. 2010). Dem Gen Prdm1 mit dem zugehörigen Protein Blimp-1 wird ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Programmierung der IL-10-Antwort von Tr1 Zellen zugesprochen, die in enger Wechselwirkung mit IL-27 und TGF- β stehe. Letzteres allerdings hemme die Induktion von Prdm1 (C. Neumann et al. 2014). Auch die Expression der koinhibitorischen Oberflächenproteine PD-1 (Gen: Pcd1) und CTLA-4, die für die Herunterregelung der Immunantwort sorgen (Murakami & Riella 2014), wurde untersucht; hierauf wird jedoch an anderer Stelle detailliert eingegangen (s. 3.4, S. 56).

Hinsichtlich IL-27 mit seinen beiden Untereinheiten eBi3 und p28 konnte in wiederholten rt-qPCRs eine tendenziell leicht erhöhte, aber nicht signifikant verstärkte hepatische Expression in CRP-MBP x B10.PL Mäusen gegenüber der Vergleichsgruppe detektiert werden (CRP-MBP x B10.PL: eBi3: 1,374, n= 10, p= 0,0545; p28: 1,702, n= 10, p= 0,1457), selbiges lässt sich für c-Maf (CRP-MBP x B10.PL: 1,398, n= 10, p= 0,4598) und für das Gen des antiinflammatorischen IL-10 (CRP-MBP x B10.PL: 1,743, n= 10, p= 0,1011) feststellen (Abb. 18); die Expressionswerte sind hierbei relativ zur normalisierten Kontrolle angegeben (s. 2.12.14). Dass bei IL-10 keine größere Expression gemessen werden konnte, überraschte im Hinblick auf die zuvor in den Lebern der transgenen Tiere beobachtete hohe Frequenz von Tr1-phänotypischen Zellen, deren Leitzytokin IL-10 ist (Roncarolo et al.

2001). Andererseits ist zu berücksichtigen, dass in den hier durchgeführten Versuchen Gesamtlebergewebe analysiert wurde. Hierbei kann es durch die Gene des Parenchyms zu Überlagerungen der Effekte kommen, weshalb möglicherweise nicht mehr als eine Tendenz in den Ergebnissen erwartet werden kann.

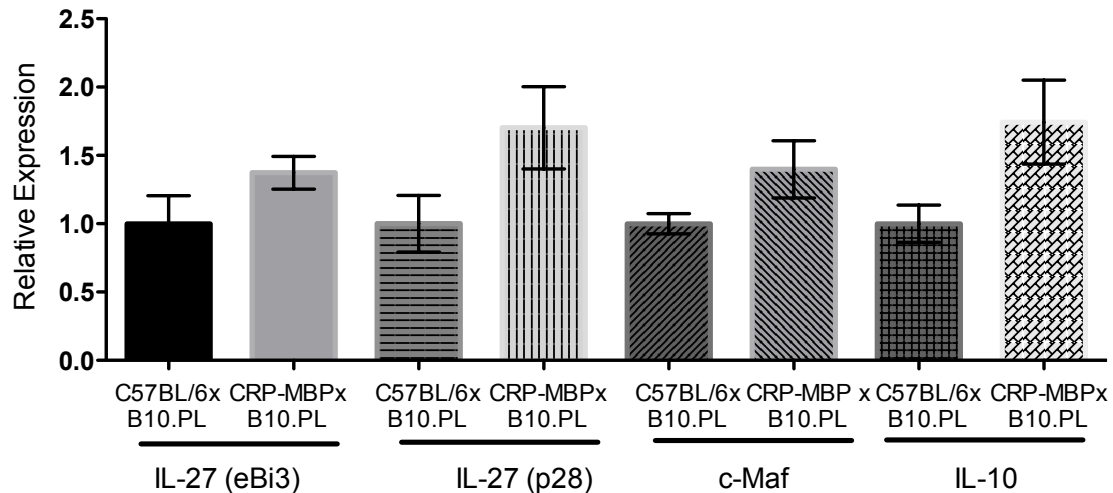


Abb. 18: Relative Expression der Gene IL-27 (eBi3- und p28-Untereinheiten), c-Maf und IL-10 in Gesamtlebergewebe aus CRP-MBP x B10.PL Tieren; *Hprt1* als *housekeeping* Gen; normalisiert auf Kontrolle C57BL/6 x B10.PL. Analyse an Tag 7 nach MBP-Immunsierung und Tag 6 nach Transfer von tg4 Zellen.

Die Untersuchung des Gens für den Transkriptionsfaktor Ahr zeigte keinerlei Induktion, im Gegenteil glichen sich hier beide Gruppen sehr (CRP-MBP x B10.PL: 1,035, n= 10, p= 1; keine Abbildung).

Die signifikant verstärkte Genexpression des eher proinflammatorischen IL-6 (CRP-MBP x B10.PL: 3,589, n= 10, p= 0,0266; Abb. 19) bekräftigte die bisher beschriebenen Ergebnisse, dass in den Lebern der transgenen Mäuse ein entzündlicher Prozess moderaten Ausmaßes abläuft, welcher bereits histologisch sowie mittels der Serum-Transaminasen-Messung charakterisiert wurde (s. 3.1). Des Weiteren steht die gefundene, deutlich signifikant erhöhte Expression von TGF- β (CRP-MBP x B10.PL: 3,192, n= 10, p= 0,0031; Abb. 19) in Einklang mit den in CRP-MBP x B10.PL beobachteten gesteigerten Frequenzen von Foxp3⁺ Tregs, deren hepatische Generierung in der Peripherie TGF- β -abhängig ist (Lüth et al. 2008).

Übereinstimmend mit den durchflusszytometrischen Analysen bzgl. des Tr1-Phänotyps, für dessen Induktion Blimp-1 (entsprechend dem Gen *Prdm1*) eine wichtige Rolle zuerkannt wird (Neumann et al. 2014), zeigte sich in unseren rt-qPCR-Messungen eine signifikant verstärkte Expression dieses Gens (CRP-MBP x B10.PL: 4,75, n= 10, p= 0,0062) in den transgenen Mäusen (Abb. 19). Dies konnte in mehreren Messungen validiert werden.

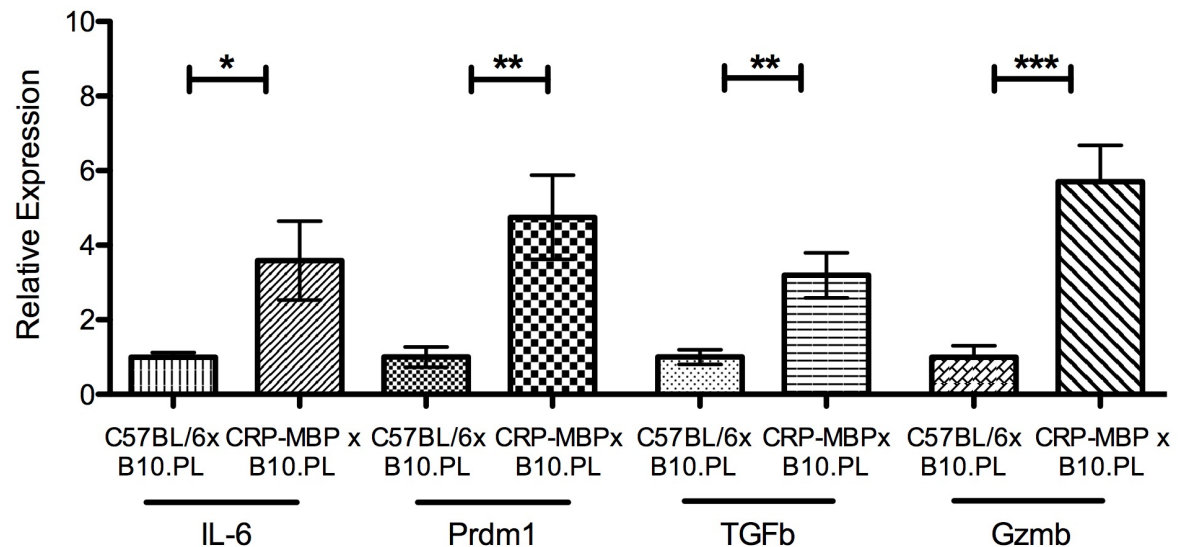


Abb. 19: Relative Expression der Gene IL-6, Prdm1 (=Blimp-1), TGF- β und Gzmb (=Granzym B) in Gesamtlebergewebe aus CRP-MBP x B10.PL Tieren; Hprt1 als *housekeeping* Gen; normalisiert auf Kontrolle C57BL/6 x B10.PL. Analyse an Tag 7 nach MBP-Immunisierung und Tag 6 nach Transfer von tg4 Zellen.

Auch die Genexpression von Granzym B (Gzmb), welches über die Tötung von myeloiden APCs einen Tr1-vermittelten suppressiven Effekt hat (Yao et al. 2015), wurde mittels rt-qPCR überprüft. Hier wurde eine verstärkte Expression von Granzym B in den Versuchstieren gemessen (CRP-MBP x B10.PL: 5,701, n= 10, p= 0,0002), die ebenfalls hoch signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe ausfiel (Abb. 19).

Gleichwohl fiel insgesamt eine Tendenz zur leicht verstärkten Genexpression bei den transgenen Tieren auf (Abb. 18, 19). Dieser Effekt könnte teilweise der Tatsache geschuldet sein, dass aufgrund der ektopischen MBP-Expression viele Zellen des Immunsystems nach MBP-Immunisierung in die Leber migrieren und die gesamte RNA dieser absolut betrachtet erhöhten Zellanzahl in die qPCR-Analyse eingeht. Es erscheint ebenfalls denkbar, dass die Unterschiede zwischen den Gruppen bei Betrachtung isolierter Leberlymphozyten noch deutlicher ausfielen. Entsprechende Untersuchungen sollten daher folgen.

Zusammengenommen deuten die Genexpressionsanalysen also auf verschiedene antiinflammatorische Effekte hin, die Zytokin-bedingt über Blimp-1-induzierte Tr1-phänotypische Zellen vermittelt sein könnten.

3.2.3 Korrelation von Zytokinproduktion und Tr1-Phänotyp in IL10gfp Reporter-Mäusen

Unter Berücksichtigung der bisherigen Ergebnisse lassen sich also Hinweise auf das Vorkommen bzw. die Relevanz von Tr1 Zellen in dem betrachteten Modell der AIH finden. Zuvorderst ist die durchflusszytometrische Analyse mit auffallend hohem Anteil von CD4+Foxp3-CD49b+Lag-3+ Zellen in den Lebern der transgenen Mäuse zu nennen (s. 3.2.1), außerdem die Genexpressionsprofile mit hochreguliertem Blimp-1, TGF- β und Granzym B (s. 3.2.2). Wünschenswert wäre eine direkte Anfärbung des Leitzytokins IL-10, um eine durchflusszytometrische Analyse im Hinblick auf das Zytokinprofil bzw. zur Sortierung der Tr1-phänotypischen Zellen zu ermöglichen. Diese IL-10-Färbung gelingt indes nicht in ausreichender Qualität, weshalb die Generierung einer IL-10-Reportermaus eine Detektion von IL-10 erleichtern sollte (Kamanaka et al. 2006; Bouabe 2012). Im nächsten

Schritt könnte diese Maus für einen Suppressionsassay verwendet werden, bei dem die transferierten Tr1-phänotypischen bzw. IL-10-produzierenden Zellen auf ihr inhibitorisches Potential hin untersucht würden. Hierfür erfolgte eine Kreuzung von tg4 Tieren mit IL10gfpFoxp3rfp-„tiger“-Reportermäusen, bei denen durch einen x-chromosomalen Knock-in IL-10-produzierende Zellen grün und Foxp3-positive Zellen rot fluoreszieren. Auf diese Art konnte eine FACS-Sortierung der IL-10-produzierenden Zellen aus den entstandenen tiger x tg4 Mäusen anhand des gfp-Signals unter Ausschluss von foxp3rfp-positiven Zellen erfolgen.

Um auszuschließen, dass transferierte Zellen aufgrund ihrer Fluorochrome in den Empfängern vernichtet würden, wurden als Empfänger CRP-MBP x tiger x B10.PL Mäuse verwendet, welche dieselben Fluorochrome aufweisen und daher gfp-tolerant sind.

In einem adoptiven Transferversuch wurden je 5×10^6 tiger x tg4 CD4⁺ T-Zellen in vortags mit MBP immunisierte CRP-MBP x tiger x B10.PL Mäuse transferiert. An Tag 7 nach MBP-Immunisierung konnten in der durchflusszytometrischen Analyse die transferierten Zellen anhand des CD45.1/CD45.2 Markers identifiziert und auch die Induktion des CD49b+Lag-3⁺ Tr1-Phänotyps beobachtet werden (CRP-MBP x tiger x B10.PL: 26,0% der CD45.1-CD4⁺Foxp3⁻ Zellen; Abb. 20, 21A). Die Betrachtung des IL-10gfp Signals jedoch zeigte unerwartet nur eine sehr geringe Anzahl von IL-10-produzierenden Zellen mit lediglich 4,6% der NPCs (Abb. 20, 21B) und 0,8% der Milzzellen der Spendertiere (Abb. 20). Bei Eingrenzung der analysierten Zellen auf CD45.1-CD4⁺ T-Zellen lag der Anteil zwar höher, allerdings mit 3,35% in der Milz bzw. 8,55% in der Leber weiterhin auf niedrigem Niveau.

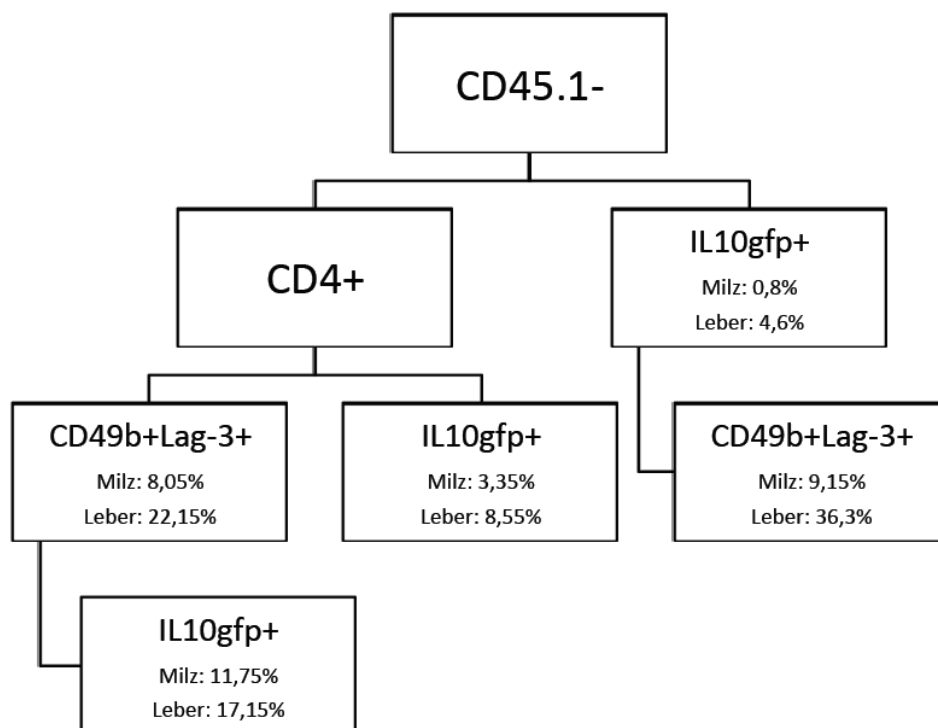


Abb. 20: Darstellung der unterschiedlichen FACS Gating-Strategien und der betrachteten Zellpopulationen beim adoptiven Transfer-Versuch mit tiger x tg4 Spendern und CRP-MBP x tiger x B10.PL Empfängern. Analyse an Tag 7 nach MBP-Immunisierung und Tag 6 nach Zelltransfer.

Diese Diskrepanz, die noch deutlicher wird, wenn die IL10gfp-positiven Zellen hinsichtlich des Tr1-Phänotyps CD49b+Lag-3+ (Milz: 9,15%, Leber: 36,3%) untersucht wurden (Abb. 20), erschien verwunderlich, sollten doch nahezu alle Tr1 Zellen ihr Leitzytokin IL-10 produzieren. Aber auch die umgekehrte Analyse, bei der die IL10gfp-Positivität der Tr1-phänotypischen Zellen betrachtet wurde (Milz: 11,75%, Leber: 17,15%), bestätigte die Inkohärenz zwischen Tr1- und IL-10-Signal (Abb. 21), welche eigentlich deckungsgleich zu erwarten wären, sofern tatsächlich alle Tr1 Zellen auch IL-10 produzieren.

Daher drängte sich die Hypothese auf, dass in unserem Modell des adoptiven Transfers im Rahmen des EAE-Mausmodell dem immunsuppressiven Effekt von Tr1-Zellen über das antiinflammatorische IL-10 keine größere Bedeutung zukommt, was in einem weiteren Ansatz über die Ausschaltung des IL-10-Signalweges überprüft werden sollte.

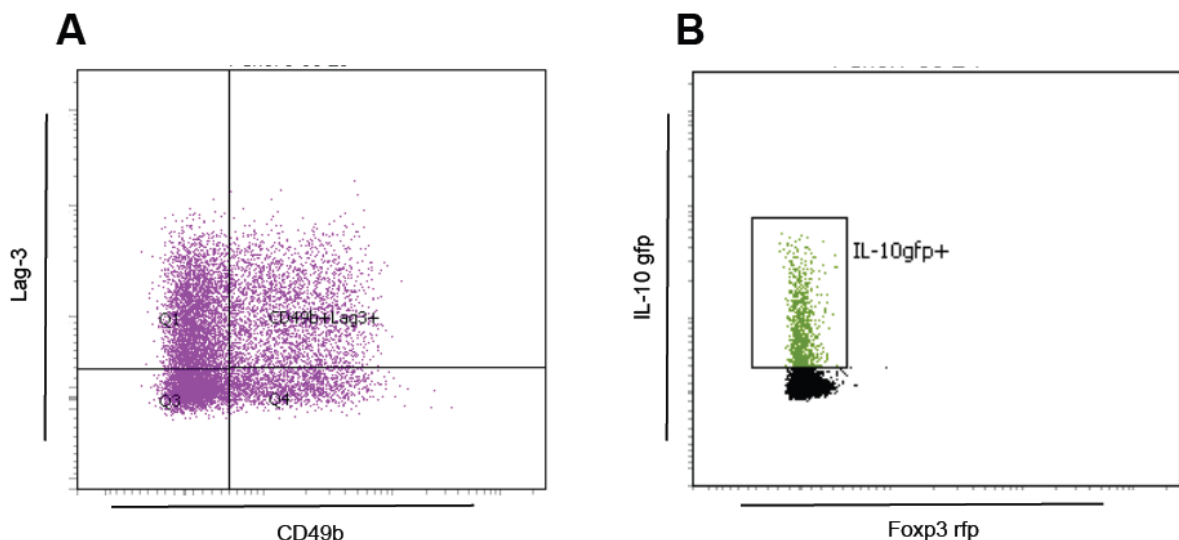


Abb. 21: (A) Population der CD4+Foxp3-CD49b+Lag-3+ Spenderzellen aus tiger x tg4 Mäusen und Population der IL-10gfp+ Zellen (B) in CRP-MBP x tiger x B10.PL Mäusen. Analyse von NPCs aus der Leber an Tag 7 nach MBP-Immunisierung und Tag 6 nach Zelltransfer.

3.3 Inhibierung suppressiver Signalwege zur Durchbrechung der hepatisch induzierten Toleranz

3.3.1 Inhibierung des IL-10-Signalweges *in vivo*

Die Ausschaltung des IL-10-Signalweges wurde in zwei verschiedenen Strategien verfolgt. Zum einen durch die Anwendung eines gegen den IL-10-Rezeptor gerichteten Antikörpers (IL10-R-AK, Hybridom aus der Arbeitsgruppe Samuel Huber), welcher erstmalig 24 bis 48 Stunden vor der MBP-Immunisierung, danach einmal wöchentlich intraperitoneal appliziert wurde (150mg je Anwendung und Maus). Zum anderen durch Verwendung von Mäusen der Linie CRP-MBP x cd4-DN-IL10R x tg4, deren T-Zellen aufgrund der Überexpression der IL-10-Rezeptor- α -Kette insensitiv gegenüber dem Interleukin sind. Es kann dabei von einer guten Ausschaltung des IL-10-Signalweges ausgegangen werden (Kamanaka et al. 2011). Des Weiteren weisen Mäuse dieser Linie auch MBP-spezifische T-Zellen auf, nahezu alle CD4+ T-Zellen zeigen die Expression der V β 8.2-Kette, auch noch am Ende des

Immunisierungszeitraumes (Abb. 3B, 22B), sodass eine MBP-spezifische Immunreaktion erfolgen kann.

Nach der MBP-Immunisierung sollte, um die Vermutung der IL-10-Abkömmlichkeit für die hepatische Toleranz zu verifizieren, in beiden Herangehensweisen die Toleranz der Mäuse erhalten bleiben. Tatsächlich konnte genau dies in den Versuchen gesehen werden: es kam in keinem Fall zum Auftreten einer EAE (Abb. 22A); einige der Immunisierungen wurden hierbei noch von Alena Laschtowitz durchgeführt. Weder histologisch mit lediglich marginalen Zellinfiltraten noch bei der Transaminasen-Messung (keine Abbildung) wurden Anzeichen einer Leberentzündung bei den mit Antikörper behandelten Tieren gesehen. Die Blockade des IL-10-Signalweges führte dementsprechend nicht zu einer EAE oder Leberschädigung, was als Bestätigung der Hypothese gewertet wurde.

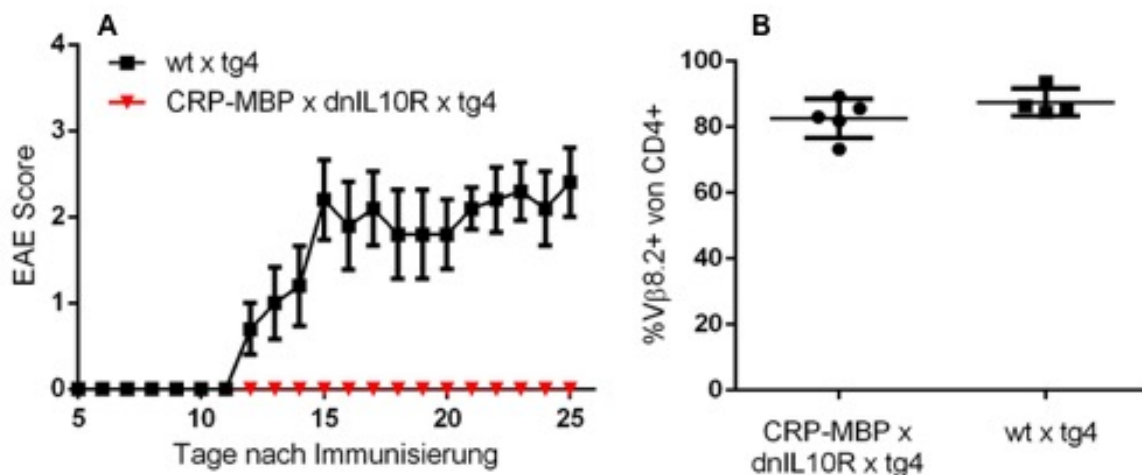


Abb. 22: EAE-Verlauf nach MBP-Immunisierung (A) und Expression der Vβ8.2-Kette auf CD4+ T-Zellen aus der Milz (B) von CRP-MBP x cd4-DN-IL10R x tg4 Mäusen an Tag 26 nach Immunisierung mit MBP. Als Kontrolle dienten C57BL/6 x tg4 Mäuse.

3.3.2 Kombinierte Inhibition der IL-10- und TGF-β-Signalwege

Es erscheint denkbar, dass sich die beiden suppressiven Signalwege über IL-10 und TGF-β gegenseitig kompensieren könnten; bei Inhibierung des einen Signalweges könnte über den anderen redundanten Mechanismus ein größerer antiinflammatorischer Effekt erfolgen, der den Ausfall des einen Signalweges kompensiert und somit das Auftreten einer EAE oder Leberschädigung in unserem Modell verhindert. Daher sollten die IL-10- und TGF-β-Signalwege beide zugleich blockiert werden.

TGF-β ist ein notwendiger Faktor für die Generierung von peripheren CD4+CD25+ Tregs (Wan & Flavell 2006): eine Depletion von Tregs mittels eines gegen CD25 gerichteten Antikörpers (PC61.5.3) simuliert dadurch die Ausschaltung des TGF-β-Signalweges.

Die kombinierte Ausschaltung der Toleranzmechanismen wurde herbeigeführt, indem einerseits CRP-MBP x cd4-DN-IL10R x tg4 Mäuse mit dem Treg-depletierenden PC61.5.3-AK (500µg/Maus i.p., zweimal wöchentlich) behandelt wurden. Zusätzlich zu der genetisch bedingten IL-10-Insensitivität der CD4+ T-Zellen wurden hier TGF-β-abhängig generierte Tregs depletiert und so die Inhibierung des TGF-β-Signalweges simuliert (Abb. 23).

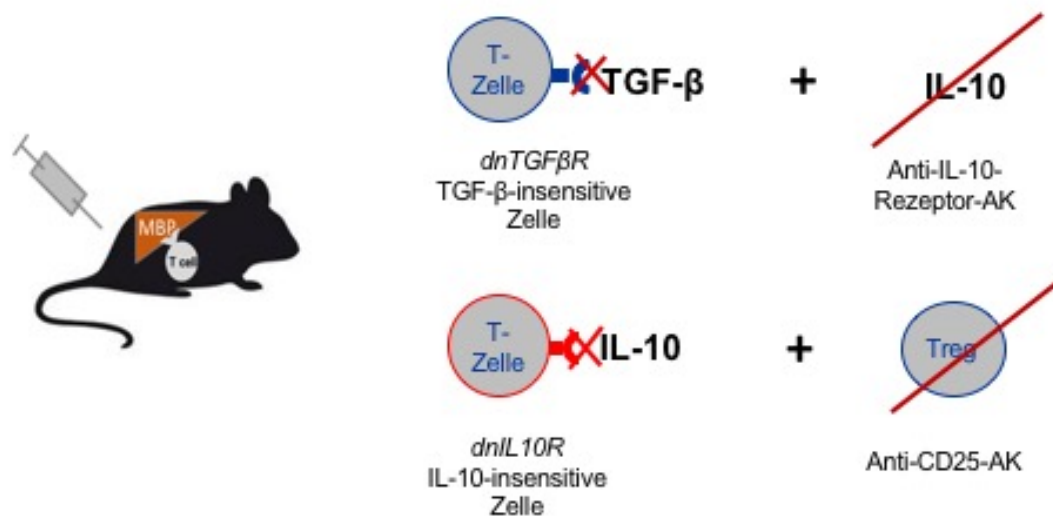


Abb. 23: Schema zur Veranschaulichung der durchgeführten kombinierten Inhibitionen der Signalwege von IL-10 und TGF- β . CRP-MBP x hCD2- Δ κ T β R II x tg4 Mäusen wurde der IL10R-AK i.p. injiziert; CRP-MBP x cd4-DN-IL10R x tg4 Mäusen wurde der anti-CD25-AK i.p. injiziert. Beide Mauslinien waren zuvor mit MBP immunisiert worden.

Tatsächlich wiesen die PC61.5-AK-behandelten Mäuse bei Versuchsende nahezu keine Foxp3+CD25^{high}-Tregs mehr in der Milz auf (Abb. 24), mit signifikantem Unterschied zu den mit Isotyp behandelten Wurfgeschwistern (CRP-MBP x cd4-DN-IL10R x tg4+PC61.5.3: 0,46% vs. CRP-MBP x cd4-DN-IL10R x tg4: 14,86%, n= 5 vs. 5, p= 0,0119).

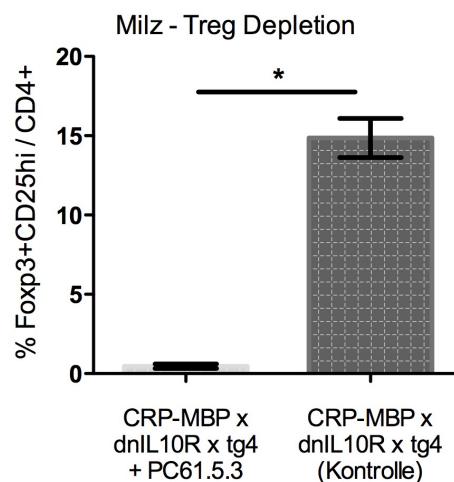


Abb. 24: Population von Foxp3+CD25^{high} Tregs aus der Milz von CRP-MBP x cd4-DN-IL10R x tg4 Mäusen mit zweimal wöchentlicher Gabe von 500 μ g PC61.5.3-AK i.p. (Kontrolle ohne AK-Behandlung). Analyse an Tag 26 nach MBP-Immunisierung.

Andererseits wurde CRP-MBP x hCD2- Δ κ T β R II x tg4 Mäusen der IL10R-AK (150mg/Maus i.p., einmal wöchentlich) verabreicht, was für die Ausschaltung des IL-10-Signalweges in Mäusen mit genetisch bedingt TGF- β -insensitiven T-Zellen sorgte (s. Abb. 23).

Einen Tag vor der MBP-Immunisierung an Tag 0 wurden die Antikörper erstmalig intraperitoneal verabreicht (Tag -1), danach ein- (anti-IL10R) bzw. zweimal (anti-CD25) wöchentlich bis zum Ende des Versuches an Tag 25. Aus beiden transgenen Mauslinien wurden zu-

sätzliche Tiere als unbehandelte Kontrollen verwendet; diese blieben nach der MBP-Immunisierung gesund. Außerdem dienten immunisierte C57BL/6 x tg4 Mäuse als „krank“-Kontrollen, die eine EAE entwickelten (Abb. 25A+B).

Es zeigte sich, dass sowohl die mit anti-CD25-AK behandelten CRP-MBP x cd4-DN-IL10R x tg4 Mäuse (Abb. 25A) als auch die CRP-MBP x hCD2- $\Delta\kappa\text{T}\beta\text{R II}$ x tg4 Mäuse mit IL10R-AK-Anwendung (Abb. 25B) nach MBP-Immunisierung keinerlei EAE-Symptome aufwiesen. Dass trotz der Blockierung beider suppressiven Signalwege die Toleranz erhalten blieb, deutet darauf hin, dass in der Leber neben IL-10 und TGF- β weitere redundante, noch nicht identifizierte Mechanismen existieren, die für die Aufrechterhaltung der Toleranz verantwortlich sind.

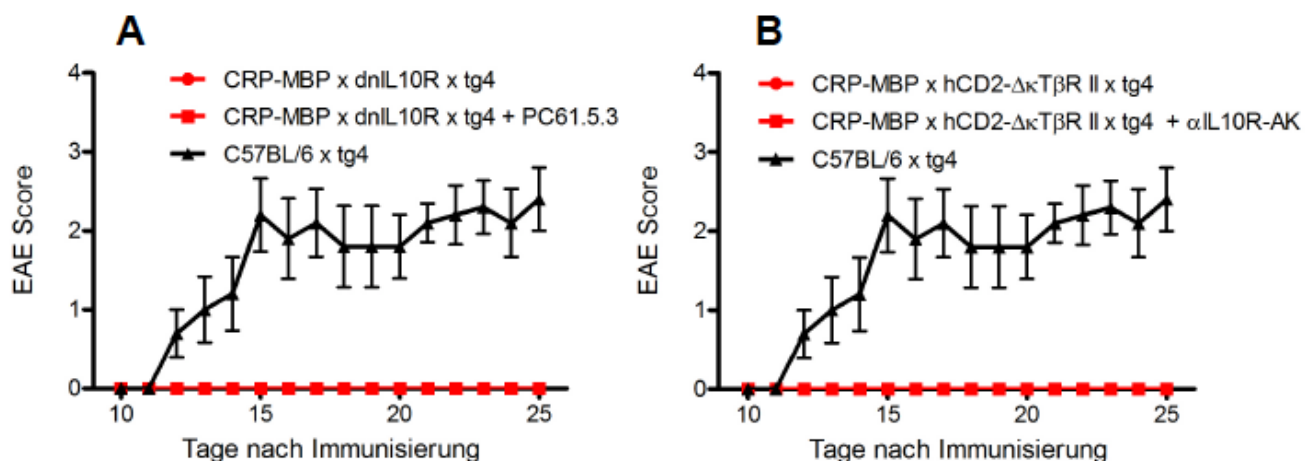


Abb. 25: EAE-Verlauf nach MBP-Immunisierung von (A) CRP-MBP x cd4-DN-IL10R x tg4 Mäusen mit bzw. ohne PC61.5.3-AK-Behandlung. (B) zeigt den EAE-Verlauf von CRP-MBP x hCD2- $\Delta\kappa\text{T}\beta\text{R II}$ x tg4 Mäusen mit bzw. ohne anti-IL10R-AK-Behandlung. Als Kontrolle dienten C57BL/6 x tg4 Mäuse.

3.4 Charakterisierung der inhibitorischen Oberflächenmoleküle PD-1 und CTLA-4

3.4.1 Analysen der Genexpression

Aufgrund der antiinflammatorische Wirkung von CTLA-4 und PD-1 im Zusammenhang mit Autoimmunität, deren genaue Mechanismen noch diskutiert werden (Fife & Bluestone 2008; Romo-Tena et al. 2013; L. Chen & Flies 2013), sollte die Expression dieser beiden Moleküle im vorliegenden Mausmodell mittels rt-qPCR überprüft werden.

Tatsächlich zeigten sich die auffälligsten Hochregulierungen unter allen untersuchten Kandidaten (s. auch 3.2.2) bei den Genen für die koinhibitorischen Oberflächenmoleküle CTLA-4 und PD-1 (Gen: *Pdcd1*; Abb. 26A+B). Fiel die hoch signifikante, ungefähr sechsfach verstärkte Expression des Rezeptors PD-1 (CRP-MBP x B10.PL: 6,007, n= 10, p= 0,0002; Abb. 26B) bereits auf, so manifestierte sie sich bei CTLA-4 (Abb. 26A) mit einer noch wesentlich höheren, ca. 16-fach verstärkten Expression (CRP-MBP x B10.PL: 16,10, n= 10, p <0,0001). Diese Ergebnisse lassen die Vermutung aufkommen, dass für die hepatisch induzierte Toleranz in den transgenen Mäusen die inhibitorischen Effekte über CTLA-4- und PD-1-Engagement mit verantwortlich sein könnten. Daher erscheint eine weiter gehende

Analyse, beispielsweise ihrer möglichen Expression auf Leberzellen oder über blockierende Antikörper bzgl. des PD-1-Liganden PD-L1, sinnvoll.

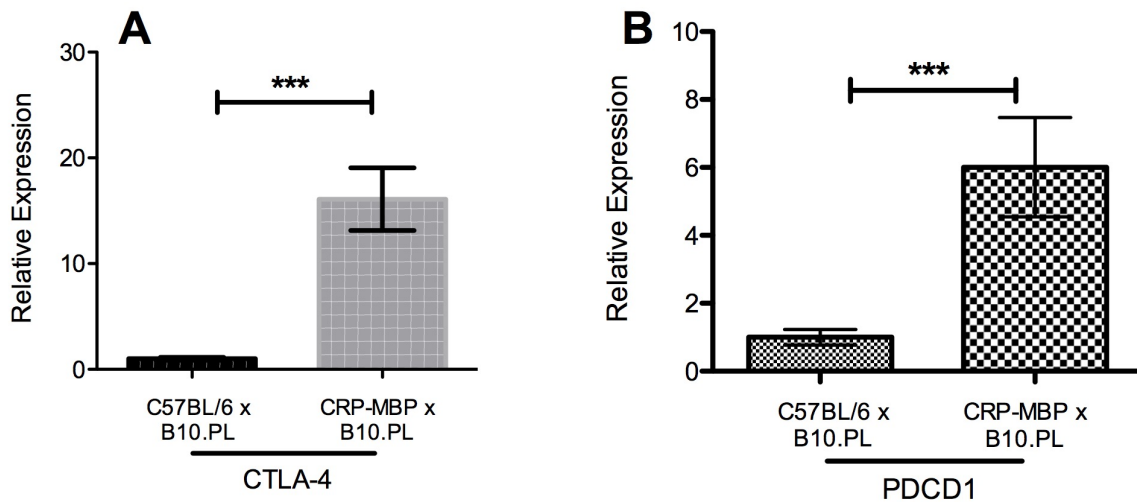


Abb. 26: Relative Expression der Gene CTLA-4 (A) bzw. PDCD1 (B) in Gesamtlebergewebe aus CRP-MBP x B10.PL Tieren; *Hprt1* als *housekeeping* Gen; normalisiert auf Kontrolle C57BL/6 x B10.PL. Analyse an Tag 7 nach MBP-Immunisierung und Tag 6 nach Transfer von tg4 Zellen.

3.4.2 Durchflusszytometrische Untersuchungen

Aufgrund der auffällig stark hochregulierten Genexpression von CTLA-4 und PD-1 in den rt-qPCR-Daten sollte die Expression dieser beiden Moleküle auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch im Modell des adoptiven Transfers überprüft werden.

Dabei zeigte sich deutlich, dass die transferierten tg4 Zellen in transgenen CRP-MBP x B10.PL Empfängern signifikant verstärkt einen PD-1-positiven Phänotyp annehmen, sowohl in der Milz (Abb. 27A) als auch in der Leber (Abb. 27B; CRP-MBP x B10.PL Milz: 95,44% vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL Milz: 89,13%; n= 5 vs. 6, p= 0,0173; CRP-MBP x B10.PL Leber: 95,76% vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL Leber: 83,87%; n= 5 vs. 6, p= 0,0043). Unterschiede zwischen den beiden Organen der transgenen Tiere wurden bezüglich des Anteils der PD-1 exprimierenden Zellen nicht gesehen, hinsichtlich der Stärke des Fluoreszenzsignals (MFI) jedoch schon. In der Milz wurde ein in beiden Versuchsgruppen ähnlich intensives Signal der transferierten CD45.1-CD45.2+CD4+ Zellen gemessen, das tendenziell, jedoch nicht signifikant, in den MBP-transgenen Tieren etwas höher ausfiel (CRP-MBP x B10.PL Milz: 7438 vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL Milz: 6376; n= 5 vs. 6, p= 0,0519; Abb. 27C). In der Leber lag die Intensität in Zellen der CRP-MBP x B10.PL Linie demgegenüber signifikant über den Zellen der nicht-transgenen Kontrollgruppe (CRP-MBP x B10.PL Leber: 9822 vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL Leber: 4414; n= 5 vs. 6, p= 0,0043; Abb. 27D). Dies deutet auf eine starke Expression des Moleküls auf der Oberfläche der CD45.1-CD45.2+CD4+ Spenderzellen hin, passend zu den prozentualen Analysen der Zellpopulationen (Abb. 27B).

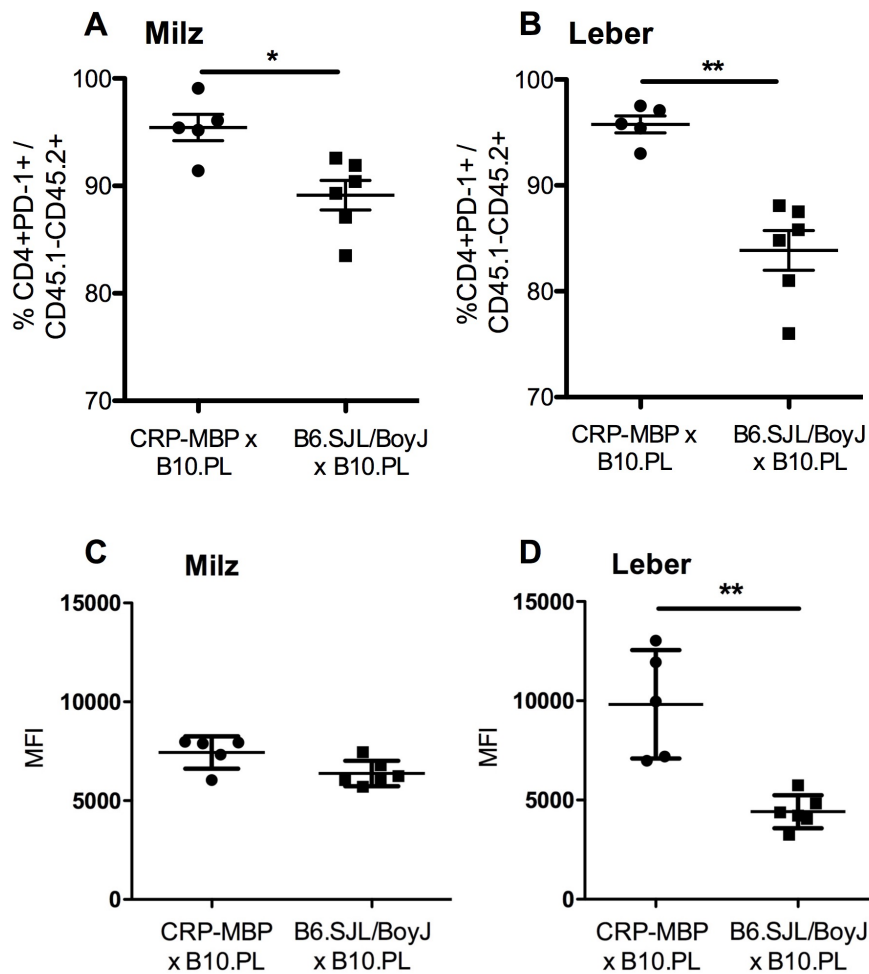


Abb. 27: Anteil der CD4+PD-1+ Zellen an CD45.1-CD45.2+ Spender-tg4-Lymphozyten in der Milz (A) und Leber (B) von CRP-MBP x B10.PL Mäusen. (C) zeigt die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des PD-1-Signals auf den transferierten CD45.1-CD45.2+CD4+ Zellen in der Milz, (D) dasselbe in der Leber. Analyse an Tag 7 nach MBP-Immunisierung und Tag 6 nach Zelltransfer, als Kontrolle dienten B6.SJL/BoyJ x B10.PL Mäuse.

Neben dem inhibitorischen PD-1 wurde die Expression des ebenfalls inhibitorischen Oberflächenmoleküls CTLA-4 untersucht. Wenngleich nicht in derselben Deutlichkeit wie bei PD-1, so zeigte sich auch hier in der Tendenz eine verstärkte Expression auf den Zellen, die MBP-transgenen Mäusen transferiert wurden, im Vergleich zu Zellen der nicht-transgenen Kontrollgruppe. Dies traf auf Milz (Abb. 28A) und Leber (Abb. 28B) zu, aufgrund eines Extremwertes fiel der Unterschied jedoch nicht signifikant aus (CRP-MBP x B10.PL Milz: 42,28% vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL Milz: 31,15%; n= 5 vs. 6, p= 0,0673; CRP-MBP x B10.PL Leber: 64,24% vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL Leber: 54,17%; n= 5 vs. 6, p= 0,1255). Während bezüglich PD-1 sowohl in der Milz als auch in der Leber eine starke Expression beobachtet wurde, scheinen CD4+CTLA-4+ Lymphozyten vor allem in der Leber zu akkumulieren (Abb. 28A+B), was auf einen Leber-spezifischeren Vorgang zurückzuführen sein könnte. Hinsichtlich der Stärke der CTLA-4-Fluoreszenzsignale (MFI) auf den transferierten CD45.1-CD45.2+CD4+ Zellen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen in der Milz (CRP-MBP x B10.PL Milz: 782,8 vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL Milz: 627,7; n= 5 vs. 6, p= 0,1775) (Abb. 28C) oder in der Leber (CRP-MBP x B10.PL Leber: 1424 vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL Leber: 971,8; n= 5 vs. 6, p= 0,2343; Abb. 28D), wobei in letzterer zumindest das generelle MFI-Niveau höher lag als in der Milz und so zu den zuvor beobachteten Ergebnissen passte (Abb. 28A+B).

Da bei Einschluss der endogenen Zellen (CD45+ gesamt) der Anteil an CD4+CTLA-4+ Zellen in der Leber von CRP-MBP x B10.PL Mäusen ebenfalls signifikant höher lag als in der Kontrollgruppe (CRP-MBP x B10.PL: 3,483% vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL: 2,0%; n= 6 vs. 6, p= 0,0161), in den Milzen dagegen kein signifikanter Unterschied bei insgesamt niedrigeren Anteilen der CD4+CTLA-4+ Zellen bestand (CRP-MBP x B10.PL: 2,34% vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL: 1,983%; n= 5 vs. 6, p= 0,6458; keine Abbildung), deuten diese Daten zusammengekommen auf eine gewisse Leberspezifität der CTLA-4-Expression hin. Aufgrund der schwankenden Werte sollte jedoch eine Wiederholung dieser Versuche erfolgen.

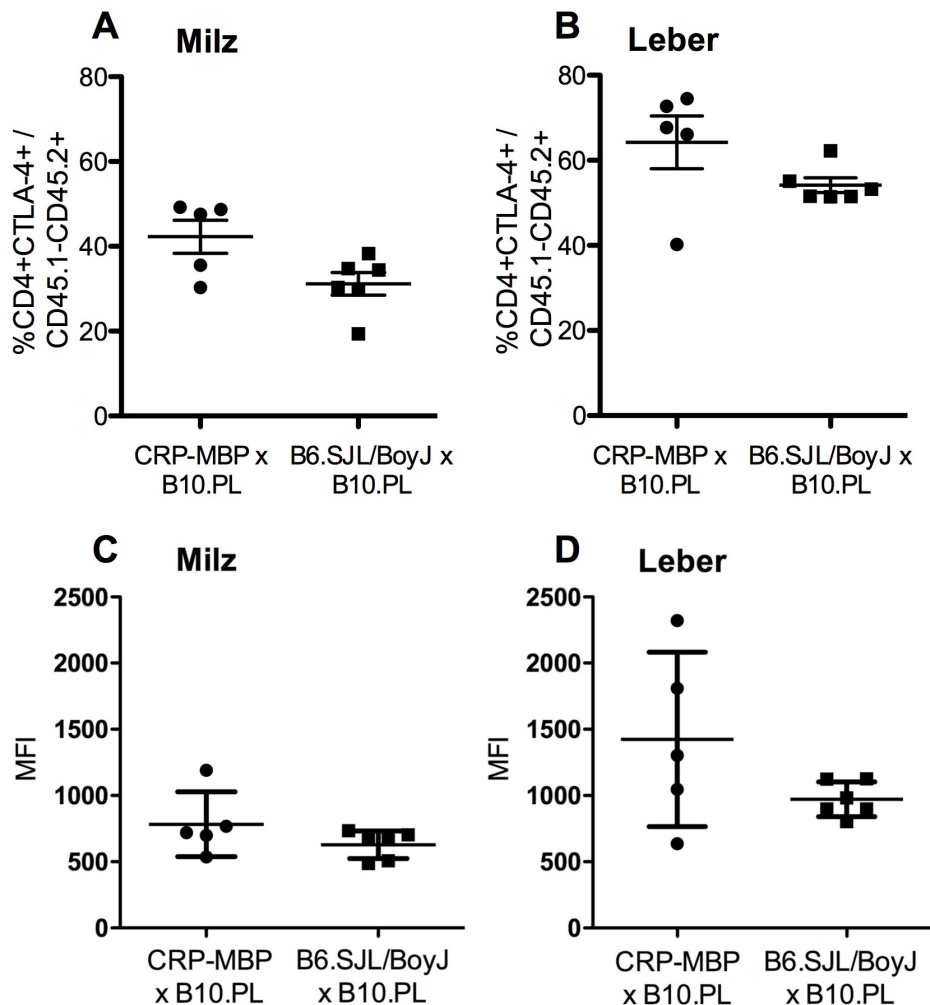


Abb. 28: Anteil der CTLA-4+-positiven CD4+ Zellen an CD45.1-CD45.2+ Spender-tg4-Zellen in der Milz (A) und Leber (B) von CRP-MBP x B10.PL Mäusen. (C) zeigt die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des CTLA-4-Signals auf den transferierten CD45.1-CD45.2+CD4+ Zellen in der Milz, (D) dasselbe in der Leber. Analyse an Tag 7 nach MBP-Immunisierung und Tag 6 nach Zelltransfer. Als Kontrolle dienten B6.SJL/BoyJ x B10.PL Mäuse.

Die inhibitorischen Oberflächenmoleküle PD-1 und CTLA-4 können nicht nur singular, sondern auch parallel exprimiert werden, was daher ebenfalls untersucht wurde. In Übereinstimmung mit den vorherigen Analysen zeigte sich, dass in CRP-MBP x B10.PL Tieren ein höherer Anteil der Spenderzellen doppelt-positiv ist. In der Milz (Abb. 29A) fiel dieser Unterschied signifikant aus (CRP-MBP x B10.PL: 42,34% vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL: 23,25%; n= 5 vs. 6, p= 0,0173), lag insgesamt aber auf einem geringeren Level als in der Leber (Abb. 29B). Dort bezifferten die CD4+CTLA-4+PD-1+ Zellen in den MBP-transgenen Tieren

mehr als die Hälfte der transferierten Zellen (CRP-MBP x B10.PL: 58,9% vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL: 43,83%; n= 5 vs. 6, p= 0,1255). Die relativen Anteile der doppelt-positiven Zellen in den Organen liegen nur unwesentlich unter den Anteilen der CTLA-4-positiven CD4+ T-Zellen. Interessanterweise ist also der Großteil der CTLA-4-exprimierenden Zellen auch PD-1-positiv, während andersherum durchaus PD-1 einfach positive Zellen vorkommen. Während PD-1 von sämtlichen aktivierten T-Zellen über einen längeren Zeitraum exprimiert werden kann, scheint die Expression von CTLA-4 limitierter zu sein bzw. einer früheren zeitlichen Regulation zu unterliegen; die höchste Expression von CTLA-4 auf T-Zellen wurde zwei bis drei Tage nach Stimulation beobachtet (Salama et al. 2003; Fife & Bluestone 2008; Walunas et al. 1994; Ansari et al. 2003). Die hier erfolgte Analyse wurde eine Woche nach Zelltransfer durchgeführt, sodass die zeitliche Überschreitung der maximalen CTLA-4-Expression denkbar erscheint. Insgesamt sollte eine Bestätigung dieser Ergebnisse in weiteren Versuchen, auch zu anderen Zeitpunkten, erfolgen.

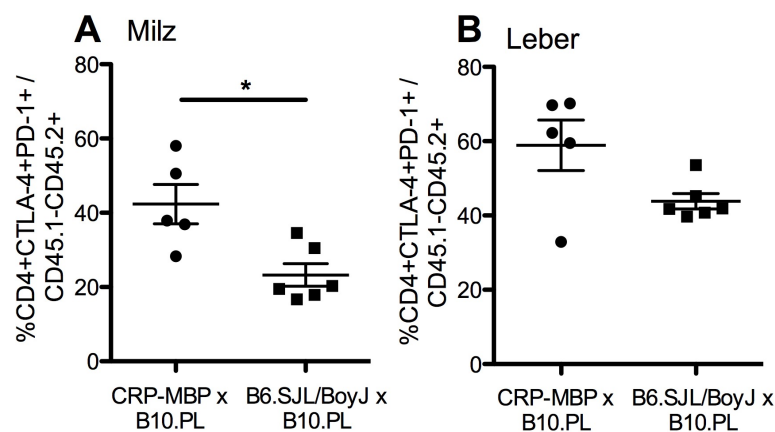


Abb. 29: Anteil der CD4+CTLA-4+PD-1+ Zellen an CD45.1-CD45.2+ Spender-tg4-Lymphozyten in der Milz (A) und Leber (B) von CRP-MBP x B10.PL Mäusen an Tag 7 nach MBP-Immunisierung und Tag 6 nach Zelltransfer. Als Kontrolle dienten B6.SJL/BoyJ x B10.PL Mäuse.

3.4.3 Inhibition der Oberflächenmoleküle PD-1 und CTLA-4 *in vivo*

Da beide Moleküle als potente Koinhibitoren beschrieben sind (Fife & Bluestone 2008; Sharpe et al. 2007; Salama et al. 2003; Romo-Tena et al. 2013) und bei den bisherigen Analysen sowohl durchflusszytometrisch (s. 3.4.2) als auch hinsichtlich der Genexpression (s. 3.4.1) ein auffällig verstärktes Vorkommen in MBP-transgenen Tieren zeigten, sollten CTLA-4 und PD-1 weiter untersucht werden. Auch waren in den durchflusszytometrischen Analysen große Anteile an doppelt-positiven CD4+PD-1+CTLA-4+ Zellen gesehen worden. In einem weiteren Versuch sollte daher die *in vivo* Blockade dieser Marker getestet werden. Es sollten die einzelne sowie die kombinierte Inhibition der Moleküle untersucht werden. Laut einer anderen Veröffentlichung (Paterson et al. 2015) ist CTLA-4 auf adulten T-Zellen der Maus für die Begrenzung der Zellerexpansion sowohl von Teffs als auch von Tregs entscheidend; eine Deletion des Moleküls auf den Zellen führe daher zu Aktivierung und Expansion. Es erschien also denkbar, dass durch Antagonisierung von CTLA-4 durch den

Antikörper nicht nur reaktive Teffs, sondern auch die protektiven Tregs expandieren würden, was einen möglichen Effekt der CTLA-4-Inhibition verschleiern könnte. Aus diesem Grund wurden die Antikörper in Kombination mit dem Treg-depletierenden PC61.5.3-AK verabreicht.

Beginnend an Tag 1 nach MBP-Immunisierung wurde den CRP-MBP x tg4 Mäusen zweimal wöchentlich 200µg CTLA-4-AK (Klon: UC10-4F10) bzw. 200µg PD-1-AK (Klon: RMP1-14) in Kombination mit 500µg PC61.5.3-AK intraperitoneal appliziert. Des Weiteren wurden einer dritten Gruppe alle drei Antikörper gemeinsam verabreicht (CTLA-4-AK, PD-1-AK und anti-CD25-AK), um die maximal mögliche Beeinflussung der Inhibitoren zu untersuchen. Als Kontrolle dienten MBP-immunisierte nicht-transgene C57BL/6 x tg4 Tiere, die ohne Antikörper-Behandlung blieben.

Es zeigte sich, dass keine der mit Antikörpern behandelten Gruppen eine EAE entwickelte, weder bei singulärer Blockade von PD-1 oder CTLA-4, noch bei kombinierter Inhibition der Koinhibitoren (keine Abbildung). Die hepatisch induzierte Toleranz scheint somit durch weitere redundante, noch nicht identifizierte Schutzmechanismen vermittelt zu werden.

4. Diskussion

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Rolle von T regulatorischen Zellen und weitere Treg-unabhängige Mechanismen bei der Vermittlung und Aufrechterhaltung von hepatisch induzierter Toleranz zu untersuchen, die vor Autoimmunität schützen. Die Grundlage für diesen Ansatz liegt in der Beobachtung, dass Mäuse mit hepatisch exprimiertem MBP-Autoantigen vor der Induktion einer EAE geschützt sind, was auf die periphere TGF- β -abhängige Induktion von CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ iTregs in der Leber aus konventionellen CD4⁺ T-Zellen zurückgeführt werden kann. Diese iTregs sind spezifisch für das Autoantigen und vermitteln auch in anderen Tieren nach adoptivem Transfer ihren protektiven Effekt (Lüth et al. 2008). Für die vorliegende Arbeit wurde mit Mäusen der Linie CRP-MBP x tg4 gearbeitet, die zusätzlich zu der ektopischen MBP-Expression in Hepatozyten noch über einen transgenen T-Zell-Rezeptor verfügen, der spezifisch für das MBP ist. In Vorarbeiten von Alena Laschtowitz konnte gezeigt werden, dass in diesen Tieren trotz des Vorkommens potentiell pathogener autoantigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen die hepatische Immuntoleranz persistiert (Laschtowitz 2018). Welche Mechanismen hierfür verantwortlich sind und ob diese durchbrochen werden können, sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

4.1 Charakterisierung des CRP-MBP x tg4 Mausmodells und Untersuchung der Rolle von CD4⁺CD25⁺ T regulatorischen Zellen für die hepatische Toleranz

Eine notwendige Voraussetzung für die Generierung einer Immunantwort gegen das Autoantigen MBP ist das Vorliegen von antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen. Da der tg4 T-Zell-Rezeptor, welcher das MBP-Peptid Ac1-9 erkennt, die V β 8.2-Kette verwendet (G. Y. Liu et al. 1995), kann diese V β 8.2-Kette näherungsweise als Marker für MBP-spezifische T-Zellen im tg4-Modell genutzt werden. Unsere Analysen in unbehandelten, nicht-immunisierten Mäusen zeigten, dass nahezu alle CD4⁺ T-Zellen die V β 8.2-Kette exprimieren und somit MBP-spezifisch sind. Dies traf sowohl für die Linie tg4 als auch für CRP-MBP x tg4 zu und ließ sich in verschiedenen Organen zeigen (Abb. 3). Eine denkbare Deletion dieser autoantigenspezifischen Zellen im Thymus im Zuge des Reifungsprozesses von T-Zellen konnte somit ausgeschlossen werden. Das gleiche Bild zeigte sich in Mäusen, deren T-Zellen einen dominant-negativen IL-10-Rezeptor oder dominant-negativen TGF- β -Rezeptor aufweisen, welche für spätere Analysen benötigt wurden. Auch diese Tiere wiesen autoantigenspezifische CD4⁺ T-Zellen auf, es kam also trotz der eingeschränkten Sensitivität gegenüber IL-10 und TGF- β nicht zu einer Bildungsstörung oder Herunterregulation des TCR (Abb. 3). Da insbesondere TGF- β im Zusammenhang mit der T-Zell-Reifung im Thymus beschrieben wurde, u.a. mit stark gesteigerter negativer Selektion von T-Zellen bei eingeschränktem TGF- β -Signalweg (Ouyang et al. 2010), wäre es auch denkbar gewesen, dass autoimmune Zellen vermehrt deletiert würden. Die gewonnenen Daten lassen jedoch den Schluss zu, dass dies in dem vorliegenden Modell nicht der Fall zu sein scheint.

Weiterhin sollte die Funktionalität der MBP-spezifischen Zellen überprüft werden, gemessen anhand ihrer Zytokinproduktion *in vitro*. Sowohl bei unspezifischer als auch bei antigenspezifischer Restimulation zeigten die MBP-spezifischen Zellen eine Produktion von IFN- γ und IL-17 als proinflammatorische Zytokine, die hepatische MBP-Expression scheint also grundsätzlich eine proinflammatorische Reaktion nicht zu verhindern (Abb. 4). Diese Beobachtung ist interessant, da für die Pathogenese der EAE insbesondere Th1- und Th17-Zellen ausgemacht wurden, deren Leitzytokine IFN- γ bzw. IL-17 sind (Constantinescu et al.

2011). Das Niveau der IFN- γ -Produktion war vergleichbar zwischen unspezifischer und antigenspezifischer Stimulation; es fiel jedoch bei Zellen aus CRP-MBP x tg4 Mäusen eine signifikant etwas niedrigere IFN- γ -Produktion auf im Vergleich zu Zellen aus tg4 Mäusen (Abb. 4). Dies könnte möglicherweise auf eine niedrigere Responsivität aufgrund der hepatisch induzierten MBP-spezifischen Toleranz zurückzuführen sein. Andererseits imponierte die signifikant höhere IL-17-Produktion von Zellen der CRP-MBP x tg4 gegenüber der tg4 Linie. Die Relevanz von Th17-Zellen für die EAE-Pathogenese ist vielfach beschrieben worden (Cua et al. 2003; Langrish et al. 2005), außerdem wird ihre Differenzierung durch IFN- γ gehemmt (Harrington et al. 2005), sodass hier bei niedrigeren IFN- γ -Spiegeln eine IL-17-Produktion durch CD4⁺ T-Zellen *in vitro* plausibel erscheint. In weiteren Versuchen könnte daher eine genauere Untersuchung des Vorkommens und der Wirkung von Th17-Zellen in CRP-MBP x tg4 Mäusen erfolgen. Insgesamt scheint jedoch die hepatische Expression von MBP keine mangelnde Stimulierbarkeit bzw. Funktionalität der Zellen *in vitro* zur Folge zu haben. Daher sollte weiterhin die Funktionalität *in vivo* überprüft werden. Sollten die MBP-spezifischen Zellen in der Lage sein, eine EAE in anderen, für eine EAE suszeptiblen Mäusen auszulösen, wäre dies eine Bestätigung ihres pathogenen Potentials. Es erfolgte dafür der adoptive Transfer (Abb. 2) von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus CRP-MBP x tg4 bzw. tg4 Mäusen in nicht-MBP-transgene Empfänger; ein Transfer protektiver MBP-spezifischer Tregs wurde dabei durch den Ausschluss CD25-positiver Zellen weitestgehend verhindert (Abb. 5). Tatsächlich zeigten die Empfänger, die Zellen aus CRP-MBP x tg4 oder tg4 Tieren erhalten hatten, einen signifikant früheren Symptombeginn und aggravierten Krankheitsverlauf gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 6); die MBP-spezifischen Zellen zeigten sich eindeutig *in vivo* funktional. Hinsichtlich der Beobachtung, dass die T-Zellen aus der tg4 Linie mit den höchsten EAE-Scores (Tab. 1) ein noch höheres pathogenes Potential als Zellen aus CRP-MBP x tg4 Mäusen zeigten, scheint ein gewisser tolerogener Effekt durch die hepatische MBP-Expression denkbar, passend zu den Ergebnissen der Zytokinproduktion bei CRP-MBP x tg4 Zellen *in vitro*. Dies sollte jedoch durch weitere Versuche überprüft werden. Auch wenn die Zellen also *in vitro* und *in vivo* funktional und reaktiv sind, scheint die MBP-Expression in der Leber doch eine Verschiebung der Immunität in Richtung Immuntoleranz zu begünstigen, welche auch *ex vivo* nachzuweisen ist.

Wie in Vorarbeiten von Alena Laschtowitz ebenfalls gesehen, ließ sich in unbehandelten CRP-MBP x tg4 Mäusen mit hepatischer MBP-Expression *in vivo* keine Neuroinflammation oder Leberentzündung nachweisen. Auch der Versuch, die hepatisch induzierte Toleranz durch eine Immunisierung mit MBP/CFA zu durchbrechen, führte nicht zum Krankheitsausbruch; die Immuntoleranz persistierte, obwohl die Tiere prinzipiell über MBP-spezifische, funktionale, autoreaktive T-Zellen verfügen. Folglich stellte sich die Frage, welche Mechanismen für die Induktion und Aufrechterhaltung der Immuntoleranz verantwortlich sind. In verschiedenen EAE-Studien sind der TGF- β -Signalweg und die Generierung von Foxp3⁺ T regulatorischen Zellen als wirksame protektive Faktoren beschrieben worden: im MOG-EAE-Modell supprimierten CD4⁺CD25⁺ Tregs die Proliferation und Zytokinproduktion von antigenspezifischen Th1-Zellen und schützten im adoptiven Transfer vor einer EAE (Kohm et al. 2002). Die ektopische Expression des MBP-Autoantigens in der Leber führt zur TGF- β -abhängigen peripheren Generierung antigenspezifischer Foxp3⁺ Tregs, welche ebenfalls einen wirksamen Schutz vor einer EAE vermittelten (Lüth et al. 2008). Da auch im CRP-MBP x tg4 Modell erhöhte Treg-Frequenzen zu finden sind, untersuchten wir im nächsten Schritt, ob die Depletion von Tregs in unserem Modell zur Durchbrechung der Toleranz führen würde. Der in der Maus für Tregs spezifische Marker Foxp3⁺ bietet sich aufgrund des intrazellulären Vorkommens nicht als Zielmolekül für die Depletion an, sodass mit dem

gegen die α -Kette des IL-2-Rezeptors gerichteten anti-CD25-Antikörper gearbeitet wurde. Die Anwendung des anti-CD25-Antikörpers bewirkte eine erfolgreiche Depletion von CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs (Abb. 7, 9A). Trotzdem kam es nach Immunisierung mit MBP nicht zu einem Ausbruch der EAE-Symptomatik, auch wurden weder histologisch noch laborchemisch in der Transaminasen-Messung Zeichen einer deutlichen Hepatitis gesehen (Abb. 8). Eine frühere Analyse an Tag 7 nach Immunisierung bestätigte diese Ergebnisse (Abb. 9). Die Immuntoleranz persistierte also trotz der Depletion von Tregs. Es lässt sich einwenden, dass die Wirkung des anti-CD25-Antikörpers nicht spezifisch genug sei, weil Foxp3 den essentiellen Faktor für die Treg-Funktion darstelle (Hori et al. 2003; O'Garra et al. 2004). Dem ist entgegenzuhalten, dass die funktionelle Inaktivierung von Tregs durch anti-CD25-Antikörper durchaus beschrieben ist (Kohm et al. 2006). Jedoch muss berücksichtigt werden, dass CD25 auch von aktivierten T-Zellen und T-Gedächtniszellen als Oberflächenmolekül exprimiert wird (Shipkova & Wieland 2012); es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass durch eine funktionelle Inaktivierung von T-Effektorzellen mittels des anti-CD25-Antikörpers deren proinflammatorisches Potential ebenfalls beeinträchtigt wurde. Demgegenüber stehen Studien, in denen eine anti-CD25-Antikörper-Behandlung in einem Modell der Lebertransplantation hauptsächlich Tregs in ihrer Funktion beeinträchtigte anstatt T-Effektorzellen, was in einer spontanen Organabstoßung resultierte (W. Li et al. 2006).

Aufgrund der oben beschriebenen möglichen Probleme bei der Applikation des anti-CD25-Antikörpers, sollte die Rolle von Tregs für die Aufrechterhaltung der hepatischen Immuntoleranz parallel in einem zweiten unabhängigen Ansatz untersucht werden: In einer weiteren Herangehensweise sollte eine Störung des TGF- β -Signalweges in den CRP-MBP x tg4 Mäusen untersucht werden. Aufgrund der TGF- β -abhängigen Konversion von iTregs aus konventionellen CD4⁺ T-Zellen in der Leber (Lüth et al. 2008; Carambia et al. 2014; Bilate & Lafaille 2012) resultiert aus einer Störung des TGF- β -Signalweges ebenfalls eine Treg-Beeinträchtigung. Zu diesem Zweck wurden Mäuse der Linie CRP-MBP x hCD2- Δ kT β R II x tg4 verwendet, deren T-Zellen einen dominant-negativen TGF- β -II-Rezeptor (hCD2- Δ kT β R II) exprimieren, sodass ihre T-Zellen TGF- β -insensitiv sind. Eine Generierung peripherer iTregs kann nur sehr eingeschränkt erfolgen. Im Thymus gebildete nTregs sind möglicherweise weiterhin vorhanden; die Bedeutung von TGF- β für die Reifung von nTregs wird noch kontrovers diskutiert (M. O. Li & Flavell 2008b). Des Weiteren wird auch in dieser Linie MBP ektopisch in Hepatozyten exprimiert, MBP-spezifische, potentiell autoreaktive tg4 Zellen liegen ebenfalls vor (Abb. 3). Zur Beurteilung, ob der eingeschränkte TGF- β -Signalweg zur Durchbrechung der hepatischen Toleranz führt, wurden die CRP-MBP x hCD2- Δ kT β R II x tg4 Mäuse mit MBP immunisiert. Im Gegensatz zu ihren nicht MBP-transgenen Wurfgeschwistern zeigten sie sich jedoch weiterhin vor einer EAE geschützt und ließen histologisch, laborchemisch und bei Betrachtung der Anzahl der Leberlymphozyten keine Hinweise auf ausgeprägte proinflammatorische Prozesse in der Leber finden (Abb. 10, 11). Die Immuntoleranz persistierte somit auch bei TGF- β -Insensitivität der T-Zellen, was den Schluss zulässt, dass eine selektive Beeinträchtigung der Treg-Generierung bzw. des TGF- β -Signalweges keine hinreichende Maßnahme zur Durchbrechung der hepatisch induzierten Toleranz darstellt. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass TGF- β nicht nur für die Treg-, sondern mit IL-6 zusammen ebenfalls für die Th17-Differenzierung notwendig ist (Veldhoen et al. 2006; Ivanov et al. 2006; Korn et al. 2009). Somit erscheint denkbar, dass in CRP-MBP x hCD2- Δ kT β R II x tg4 Mäusen weniger proinflammatorische Th17-Zellen vorliegen, die eine Autoimmunität vermitteln könnten. Es kann daher nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass sich durch die verminderte Induktion von Tregs und Th17-Zellen

in CRP-MBP x hCD2-ΔkTβR II x tg4 Mäusen tolerogene und proinflammatorische Effekte ausgleichen. Eine mögliche Option, dies genauer zu untersuchen, könnte das Einkreuzen von *DEREG*-Mäusen in unser Tiermodell darstellen: In dem *DEREG*-Mausmodell können spezifisch Foxp3⁺ Tregs über die Applikation von Diphtherietoxin hocheffizient depletiert werden (Lahl & Sparwasser 2011), was eine differenzierte Untersuchung der Rolle von Foxp3⁺ Tregs *in vivo* zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Verlauf der Immunantwort zuließe.

Da allerdings weder die Depletion von Tregs mittels des anti-CD25-Antikörpers noch ein eingeschränkter TGF-β-Signalweg in T-Zellen in der Durchbrechung hepatischer Toleranz resultierten, scheint es evident, dass weitere, Treg-unabhängige Mechanismen vorliegen müssen, die die Aufrechterhaltung der hepatischen Toleranz selbst bei eingeschränkter Treg-Aktivität gewährleisten.

4.2 Charakterisierung von MBP-spezifischen CD4⁺ Effektor T Zellen nach adoptivem Zelltransfer in CRP-MBP x B10.PL Mäusen und Untersuchung Treg-unabhängiger Mechanismen der hepatischen Immuntoleranz

Das Vorliegen von antigenspezifischen, funktionalen CD4⁺ T-Zellen in Mäusen mit hepatischer MBP-Expression konnte durch die gezeigten Daten gesichert werden. Ebenfalls als gesichert betrachtet werden kann die Tatsache, dass diese Zellen *in vivo* in MBP-transgenen Tieren nicht in der Lage waren, einen Entzündungsprozess auszulösen, auch nicht bei einem Wegfallen der TGF-β-abhängigen Suppression durch iTregs. Diese Beobachtung ließ die Vermutung aufkommen, dass die endogenen autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen durch Antigen-Erkennung im tolerogenen Lebermilieu einen antientzündlichen Phänotyp entwickeln. Um diese These zu überprüfen und das Zellschicksal genauer nachvollziehen zu können, wurde das Modell des adoptiven Transfers gewählt (Abb. 2): Nicht-tolerante CD4⁺ T-Zellen aus tg4 Mäusen ohne hepatische MBP-Expression wurden in immunisierte CRP-MBP x B10.PL Empfänger transferiert. Die Identifizierung der transferierten Zellen gelang dabei zuverlässig über die Expression des Oberflächenmoleküls CD45.2 (Abb. 12). Es stellte sich die Frage, ob die transferierten autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen in den Empfängern ihren proinflammatorischen Charakter annehmen oder aber tolerogene Eigenschaften akquirieren würden. Eine Woche nach Transfer durchgeführte Analysen zeigten ein moderates entzündliches Geschehen mit leicht erhöhten Serumtransaminasen und Lymphozyteninfiltraten in der Leberhistologie; es wurden bezüglich der absoluten Anzahl der Leberlymphozyten keine Unterschiede zur Kontrollgruppe festgestellt (Abb. 13). Ein ähnliches Bild ergab sich am vierten Tag nach Transfer, die Serumtransaminasen lagen hier noch etwas höher. Passend zu dem inflammatorischen Geschehen befand sich unter den isolierten Lymphozyten der Leber eine gesteigerte Frequenz der antigenspezifischen transferierten CD4⁺ T-Zellen (Abb. 13, 14), was die These stützt, dass die MBP-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in der Leber ihr Autoantigen erkennen und daher diese verstärkt infiltrieren. Die Toleranz gegenüber einer EAE blieb aber trotz des transienten entzündlichen Geschehens in der Leber weiterhin erhalten. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass zumindest ein Teil der transferierten Zellen der tg4 Spender-Tiere einen toleranten Charakter angenommen hatte.

Ergebnisse aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe lieferten Hinweise darauf, dass Typ 1 regulatorische Zellen (Tr1) im verwendeten Modell eine Rolle spielen könnten (Laschtowitz 2018). Die protektive Funktion von Tr1 Zellen im Zusammenhang mit Autoimmunität, haupt-

sächlich bewirkt durch die Ausschüttung von IL-10, ist in verschiedenen Modellen beschrieben worden (Groux et al. 1997; Roncarolo et al. 2006). In einem ConA-Hepatitis-Modell konnte eine erhöhte Frequenz an Tr1 Zellen beobachtet werden, welche durch eine IL-10-abhängige Unterdrückung proinflammatorischer Zytokinproduktion einen Schutz vor Leberschäden vermittelten (Ye et al. 2009). Dass insbesondere die Leber im Vergleich zur Milz für die Generierung von Tr1 Zellen prädestiniert scheint, wurde auch in einer tierexperimentellen Hepatitis-B-Studie gesehen: CD4+Foxp3- Tr1 Zellen zeichneten sich *in vitro* und *in vivo* durch die Fähigkeit aus, eine Immunantwort gegen das Hepatitis B-Virus zu hemmen – bei hepatisch generierten Tr1 Zellen geschah dies wesentlich früher als bei Tr1 Zellen aus der Milz (Xu et al. 2013). Weiterhin vermittelte in einem EAE-Modell der Transfer von *in vitro* generierten, IL-10-produzierenden Tr1 Zellen in den Empfängertieren einen kompletten Schutz vor EAE bzw. sorgte selbst in besonders EAE-suszeptiblen Linien für einen signifikant abgeschwächten Krankheitsverlauf (Barrat et al. 2002). Eine Beteiligung von Tr1 Zellen an der Immuntoleranz in unserem Modell erschien daher denkbar.

Die Identifizierung von Tr1 Zellen erfolgte in Ermangelung eines spezifischen Transkriptionsfaktors ursprünglich anhand ihres Zytokinprofils (Groux et al. 1997; Bacchetta et al. 2002; H. Zeng et al. 2015), einer neueren Publikation zufolge sollen Tr1 Zellen über die Koexpression der Oberflächenmoleküle CD49b und Lag-3 ebenfalls sicher charakterisiert werden können (Gagliani et al. 2013; Abb. 15). Mittels der CD49b und Lag-3 Koexpression zeigte sich, dass in unserem Transfer-Modell nach einer Woche ein hoher Anteil von durchschnittlich bis zu 30% der transferierten CD4+ T-Zellen in der Leber von MBP-transgenen Mäusen einen Tr1-Phänotyp aufwies, signifikant mehr als in der Kontrollgruppe ohne hepatische MBP-Expression (Abb. 16). Auch in der Milz von CRP-MBP Tieren ließ sich tendenziell ein deutlich höherer Anteil an Tr1 Zellen finden, wenngleich auf insgesamt niedrigerem Niveau als in der Leber. Diese Unterschiede nivellierten sich, wenn die Analysen an Tag 3 nach Transfer durchgeführt wurden: zu diesem frühen Zeitpunkt machten Tr1 Zellen weniger als 10% der transferierten Zellen in der Leber aus, in der Milz weniger als 5%, jeweils ohne signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (Abb. 17). Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die Ausbildung des Tr1-Phänotyps in den transferierten CD4+ T Zellen einige Tage bis zur vollen Ausprägung benötigt und erst nach Antigenerkennung in der Leber, welche hierfür prädestiniert zu sein scheint (Xu et al. 2013), beginnt. Die an Tag 7 beobachteten Frequenzen von durchschnittlich bis zu 30% decken sich mit Daten aus dem ConA-Hepatitis-Modell, in welchem 32% der CD4+ T Zellen einen Tr1 Phänotyp aufwiesen (Ye et al. 2009).

In einem weiteren Ansatz zur Untersuchung der Induktion von Tr1 Zellen wurden hepatische Genexpressionsprofile angefertigt. Tr1 Zellen differenzieren aus CD4+ T-Zellen unter dem Einfluss der Interleukine IL-10 und IL-27, wobei auch die Anwesenheit von TGF- β und IL-6 zur Differenzierung beitragen kann (Awasthi et al. 2007; Stumhofer et al. 2007). Relevant sind hierbei insbesondere der Transkriptionsfaktor Ahr zusammen mit c-Maf sowie für die IL-10-Produktion auch Prdm1 bzw. über den Egr-2-Signalweg das Protein Blimp-1 (Iwasaki et al. 2013; Apetoh et al. 2010). Die in der Tendenz erhöhte, aber nicht signifikant stärkere Expression von c-Maf, IL-10 und IL-27 in Mäusen mit ektopischer MBP-Expression in der Leber (Abb. 18) ließ vermuten, dass eine Induktion des Tr1-Phänotyps in gewissem Umfang ablaufen könnte. Hinsichtlich der Genexpression erscheint es folgerichtig, dass mit eBi3 und p28 die beiden Untereinheiten des IL-27 (Pflanz et al. 2002) eine annähernd gleiche Induktion aufweisen (Abb. 18). Insgesamt sollte berücksichtigt werden, dass die Expression der Tr1 assoziierten Gene in Gesamtlebergewebe untersucht wurde. Durch eine womöglich verstärkte Einwanderung insbesondere von CD4+ T-Zellen (Abb. 13, 14) in die

Lebern von MBP-transgenen Mäusen ist ein höherer Anteil der RNA des Gesamtlebergewebes von dieser Zellgruppe plausibel, was zu der beobachteten verstärkten Expression der betrachteten Gene beitragen könnte. Eine Wiederholung und Überprüfung der Genexpressionsprofile aus den transferierten, leberinfiltrierenden CD4⁺ T-Zellen *ex vivo* bzw. sogar mit durchflusszytometrisch aufgereinigter Spenderzellpopulation sollte jedoch, auch zu anderen Zeitpunkten nach Transfer, erfolgen.

Die signifikant verstärkte Genexpression von IL-6 (Abb. 19) wiederum steht in Übereinstimmung mit den histologischen und laborchemischen Ergebnissen einer moderaten Entzündungsreaktion in der Leber von MBP-transgenen Mäusen, darüber hinaus erscheint ebenso eine Beeinflussung der Tr1-Differenzierung unabhängig von IL-27 denkbar (Jin et al. 2013). Während die signifikant erhöhte TGF- β -Expression (Abb. 19) einerseits zu der beschriebenen TGF- β -abhängigen Konversion von CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen zu CD4⁺Foxp3⁺ Tregs in MBP-transgenen Mäusen passt (Lüth et al. 2008), könnte sie andererseits auch in Teilen Ausdruck einer antigenspezifischen Aktivierung von Tr1 Zellen sein, da diese ihre suppressive Wirkung neben IL-10 ebenfalls über TGF- β entfalten (Groux et al. 1997; Roncarolo et al. 2014).

Für die starke IL-10-abhängige Suppression durch Tr1 Zellen ist die Prdm1/Blimp-1-Aktivierung von hoher Relevanz (Iwasaki et al. 2013; C. Neumann et al. 2014), weshalb die signifikant verstärkte Expression von Prdm1 in Mäusen mit MBP-Expression in der Leber (Abb. 19) in Übereinstimmung mit der hohen Frequenz Tr1-phänotypischer Zellen in diesen Tieren steht. In Studien von Lin et al. führte die Überexpression von Blimp-1 zu einem Schutz vor Autoimmunität in einem Modell des autoimmunen Diabetes, demgegenüber verursachte der Knock-out von Blimp-1 im MOG-Modell der EAE eine Exazerbation der EAE (Lin et al. 2014; Lin et al. 2013), was die Rolle von Blimp-1 in Zusammenhang mit der Suppression von Immunantworten unterstreicht. Allerdings ist die Blimp-1-abhängige IL-10-Produktion nicht auf Tr1 Zellen begrenzt, sondern vielmehr ein in verschiedenen T-Zell-Subtypen, wie z.B. Th1-Effektorzellen, verbreiteter Mechanismus (C. Neumann et al. 2014). Ein Beitrag zu der hohen Prdm1-Expression in unserem Modell durch andere T-Zell-Subtypen kann daher nicht ausgeschlossen werden und sollte gegebenenfalls durch die Verwendung einer aufgereinigten Zellpopulation überprüft werden.

Die Expression von Granzym B durch Tr1-phänotypische Zellen geht mit der suppressiv wirkenden Fähigkeit zur Perforin-vermittelten Tötung myeloider APCs einher (Grossman, Verbsky, Tollefsen, et al. 2004; Yao et al. 2015). Die beobachtete signifikant erhöhte Expression von Granzym B (Abb. 19) konnte damit als weiterer – wenngleich aufgrund der möglichen Expression durch andere Zellarten wie Zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen nicht gesicherter – Hinweis auf das Vorkommen von Tr1 Zellen angesehen werden.

Unter Berücksichtigung der *ex vivo* generierten Ergebnisse der Durchflusszytometrie und Genexpressionsanalysen, die auf das Vorkommen von IL-10-produzierenden, Tr1-phänotypischen Zellen hindeuteten, sollte eine genauere Charakterisierung *in vivo* erfolgen. Hierfür verwendeten wir MBP-spezifische CD4⁺ T-Zellen aus F1 Tieren aus tg4 und IL10gfpFoxp3rfp-„tiger“-Reportermäusen, deren Zellen bei IL-10 Produktion ein grünes, bei Expression von FoxP3 ein rotes Fluoreszenzsignal produzieren. Eine Anfärbung der Zellen durch Antikörper, deren Bindung möglicherweise mit der Funktion der Zellen interferieren könnte, wurde so vermieden. In der durchflusszytometrischen Analyse zeigte sich jedoch überraschend eine Inkohärenz zwischen dem CD49b⁺Lag-3⁺ Tr1-Phänotyp und dem IL-10gfp⁺ Signal der Zellen, die darauf hindeutete, dass nur ein geringer Anteil der CD49b⁺Lag-3⁺ Zellen auch tatsächlich IL-10 produzierte (Abb. 20, 21); die Produktion des Leitzytokins IL-10 wäre bei allen Tr1-phänotypischen Zellen zu erwarten gewesen. Eine

mögliche Erklärung dafür lässt sich in neueren Publikationen finden, die die Eignung der Koexpression von CD49b und Lag-3 als sichere Marker für Tr1 Zellen infrage stellen: Nur ein geringer Anteil *in vitro* stimulierter, IL-10-produzierender Zellen zeichne sich demnach durch die CD49b+Lag-3+ Koexpression aus (White & Wraith 2016). Auch Schmetterer et al. konnten in ihrem Modell humaner STAT3 transduzierter CD4+ T-Zellen, die durch ihre hohe IL-10- und Granzym-B-Produktion suppressiv auf andere Zellen wirkten, womit sie Tr1-phänotypischen Zellen ähnelten, keine verstärkte Expression von CD49b oder Lag-3 feststellen (Schmetterer et al. 2015), was die Zuverlässigkeit dieser Marker zur sicheren Identifikation von IL-10-produzierenden Tr1 Zellen fraglich erscheinen lässt.

Aufgrund der insgesamt relativ geringen Produktion von IL-10 in den autoreaktiven Zellen in unserem Modell ergibt sich die Schlussfolgerung, dass dort die suppressive, IL-10-vermittelte Wirkung von Tr1-phänotypischen Zellen nicht ausschlaggebend für die hepatisch induzierte Toleranz gegenüber dem Autoantigen ist. Diese Hypothese wurde durch die Ausschaltung des IL-10-Signalweges mittels zweier verschiedener Ansätze überprüft. Tatsächlich führte die Immunisierung mit MBP weder in den CRP-MBP x tg4 Tieren, deren IL-10-Signalweg durch Anwendung eines IL-10-Rezeptor-Antikörpers gestört wurde, noch in der Mauslinie mit dominant-negativem IL-10-Rezeptor auf T-Zellen (CRP-MBP x cd4-DN-IL10R x tg4) zur Auslösung einer EAE oder Leberinflammation (s. 3.3.1, Abb. 22). Da die hepatisch induzierte Toleranz in diesem Modell trotz des gestörten IL-10-Signalweges persistierte, sahen wir die Hypothese bestätigt, dass die IL-10/Tr1-vermittelte Suppression hierbei lediglich eine untergeordnete Rolle bezüglich der Toleranz darstellen konnte. Eine denkbare Erklärung könnte darin liegen, dass bei Störung eines singulären Toleranzmechanismus in einem Organismus eine Kompensation durch einen anderen Mechanismus erfolgt. Dies wäre auch hinsichtlich des bekannten schützenden Potentials von in der Leber induzierten, TGF- β -abhängig gebildeten CD4+Foxp3+ Tregs (Lüth et al. 2008; Carambia et al. 2014) plausibel, da eine Störung ihres TGF- β -Signalweges ebenfalls nicht in der Entwicklung von Autoimmunität resultierte (Abb. 10, 11). Zur Untersuchung einer möglichen gegenseitigen Kompensation dieser protektiven Mechanismen wurde die simultane Ausschaltung der IL-10- und TGF- β -Signalwege mit der Fragestellung durchgeführt, ob so die hepatisch induzierte Toleranz durchbrochen werden könnte (Abb. 23). Doch auch trotz erfolgreicher Doppelinhibierung kam es nicht zur Auslösung einer EAE (Abb. 24, 25), sodass weitere Mechanismen an der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz beteiligt sein mussten.

Als mögliche protektive Kandidaten fielen die koinhibitorischen Oberflächenmoleküle CTLA-4 und PD-1 auf, deren genetische Expression in Lebergewebe MBP-transgener Mäuse tatsächlich auffällig stark hochreguliert war, hoch signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 26). CTLA-4 stellt einen essentiellen Faktor der CD80/86-vermittelten suppressiven Funktion von CD4+Foxp3+ Tregs dar (Wing et al. 2008), selbst bei Abwesenheit von Foxp3 in Tregs (Y. Zheng et al. 2008). PD-1 kommt durch seine pleiotropen Wirkungen ebenfalls zweifelsohne eine wichtige Bedeutung bei der Modulation von Immunreaktionen zu (Fife & Pauken 2011). Beispielhaft wird dies in einem Modell der Autoimmunhepatitis deutlich, in dem die Kombination aus Verlust von Tregs durch eine frühe Thyrektomie und ausgeknocktem PD-1-Signalweg zu einem letalen Verlauf der AIH führte (Kido et al. 2008). Somit erschien eine Beteiligung von CTLA-4 und PD-1 an der hepatisch induzierten Toleranz plausibel. Da allerdings das Vorkommen beider Moleküle nicht auf eine Zellpopulation limitiert ist, sondern insbesondere PD-1 eine weite Verbreitung aufweist (Keir et al. 2008), bei den Genexpressionsanalysen jedoch mit Gesamtlebergewebe gearbeitet wurde, führten wir eine durchflusszytometrische Analyse zur genaueren Charakteri-

sierung der Oberflächenexpression durch. Die dabei beobachtete signifikant höhere, nahezu vollständige Expression von PD-1 auf den transferierten Zellen in MBP-transgenen Mäusen (Abb. 27) kann als Ausdruck der Aktivierung dieser Zellen gewertet werden, die aufgrund ihrer Antigenspezifität abläuft (Keir et al. 2008). Dabei kann die hohe PD-1-Expression auch im Rahmen der initialen Limitierung der T-Effektorzell-Aktivierung und somit als Beitrag zur hepatischen Toleranz gesehen werden (Freeman et al. 2000; Keir et al. 2008). Darüber hinaus gilt PD-1 als Marker für „ausgebrannte“ T-Zellen, die einer langanhaltenden starken Stimulation unterlagen (Wherry & Kurachi 2015). Auch dieser Aspekt könnte in unserem Modell mit dauerhafter Expression des Autoantigens relevant sein.

Für die Gewebetoleranz scheint insbesondere die Interaktion von PD-1 mit dem Liganden PD-L1 auf nicht-hämatopoetischen Zellen essentiell zu sein (Grabie et al. 2007; Keir et al. 2006), so führte die Expression von PD-L1 auf LSECs über PD-1 der zytotoxischen CD8+ T-Zellen zu deren Toleranz (Diehl et al. 2008). Eine ähnliche Interaktion mit PD-1 auf den autoreaktiven CD4+ T-Zellen könnte möglicherweise so zu deren Suppression und zur hepatischen Immuntoleranz im untersuchten Modell beitragen und sollte daher in Zukunft näher analysiert werden.

Darüber hinaus zeigte CTLA-4 eine verstärkte Expression auf CD4+ T-Zellen in der Leber, auch nahmen in den Mäusen mit hepatischer MBP-Expression signifikant mehr transferierte Zellen einen CTLA-4+PD-1+ doppelt-positiven Phänotyp an (Abb. 28, 29), was auf die Relevanz dieser Moleküle für die Aufrechterhaltung der Toleranz hindeutet und in Übereinstimmung mit der Koexpression verschiedener inhibitorischer Oberflächenmoleküle bei begrenzter Immunantwort steht (Wherry & Kurachi 2015). Diese Daten werden auch durch Beobachtungen von Crawford et al. gestützt, in deren Mausmodell einer chronischen LCMV-Infektion eine Expression von CTLA-4 und PD-1 insbesondere durch CD4+ T-Zellen erfolgte (Crawford et al. 2014). Dass die durchflusszytometrisch ermittelte CTLA-4-Expression dabei nicht so deutlich signifikant ausfiel wie bei PD-1, lässt sich möglicherweise mit einer zeitlichen Abhängigkeit der Expression bzw. gegenseitigen Ergänzung der Funktion der beiden Koinhibitoren PD-1 und CTLA-4 erklären. Untersuchungen zur zeitlichen Expression zeigten, dass CTLA-4 insbesondere die initiale Begrenzung der Immunantwort reguliere, wohingegen der Anteil von PD-1-vermittelter Suppression mit zunehmender Dauer der Aktivierung steige, wobei die exakte Steuerung der Interaktionen letztlich die schützende Wirkung vermittele (Walunas et al. 1994; Salama et al. 2003; Fife & Bluestone 2008). Es sollten daher in Zukunft weitere Analysen zu anderen Zeitpunkten erfolgen, um die zeitliche Veränderung der Expression und damit das Zusammenspiel von CTLA-4 und PD-1 besser nachvollziehen zu können; eine dauerhaft erhöhte PD-1-Expression wurde beispielsweise bei Crawford et al. in der Leber noch über einen Zeitraum von bis zu 50 Tagen beobachtet (Crawford et al. 2014).

Interessanterweise konnte die Dysfunktion hepatischer CD8+ T-Zellen mit Koexpression von CTLA-4 und PD-1 in einem Modell der chronischen HCV-Infektion durch die kombinierte Blockade dieser beiden Koinhibitoren aufgehoben und die Effektorfunktion *in vitro* vollständig wieder hergestellt werden (Nakamoto et al. 2009). In unserem Modell, in welchem hauptsächlich CD4+ T-Zellen für die Pathogenese der EAE verantwortlich sind, erscheint die entsprechende hochregulierte Koexpression von CTLA-4 und PD-1 (Abb. 28, 29) als Zeichen einer Dysfunktion jedoch ebenfalls plausibel. Die Zusammenschau der gewonnenen Ergebnisse mit Studien, die exazerbierte EAE-Verläufe bei Anwendung von entweder CTLA-4- oder PD-1-Antikörpern zeigen (Karandikar et al. 1996; Salama et al. 2003), ließ uns die kombinierte Blockade beider Koinhibitoren *in vivo* in unserem Modell der hepatisch induzierten Toleranz untersuchen. Aufgrund von Beschreibungen, dass das Fehlen

von CTLA-4 im EAE-Modell bei adulten Mäusen eine Expansion protektiver Tregs verursache (Paterson et al. 2015), verwendeten wir zusätzlich einen Treg-depletierenden anti-CD25-Antikörper. Alle Tiere zeigten sich jedoch weiterhin gegenüber der Induktion einer EAE geschützt, es kam nicht zur Auslösung von Autoimmunität, was erneut die hohe Potenz der hepatischen Immuntoleranz verdeutlichte (s. 3.4.3). Eine möglicherweise nicht vollständige Effizienz der PD-1- und CTLA-4-Depletion kann hierbei jedoch nicht ausgeschlossen werden, sodass dies in weiteren Versuchen überprüft werden sollte.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Aufrechterhaltung der Immuntoleranz von mehreren redundanten Mechanismen gewährleistet wird. Aus evolutionsbiologischer Sicht ist das Vorliegen einer Vielfalt von Strategien sinnvoll, um die Immuntoleranz aufrechtzuerhalten und die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen zu verhindern. Redundante Systeme sind in anderen Bereichen bekannt, beispielsweise bei dem Vorliegen redundanter Gen-Duplikate für Signaltransduktionsfaktoren oder bei Zytokinen mit redundanter Rezeptorenbindung (Nowak et al. 1997; Kafri et al. 2009).

Weder die Ausschaltung isolierter tolerogener Mechanismen der Toleranz wie die Depletion von Tregs, die Inhibierung des Tr1/IL-10-Signalweges oder der Koinhibitoren CTLA-4 und PD-1, noch die kombinierte Blockade dieser Mechanismen führte bei den MBP-transgenen Mäusen zur Auslösung von Autoimmunität im Sinne einer Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis. Zusammengefasst lässt sich daher auf Basis der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse die Aussage treffen, dass weder Tregs noch IL-10, PD-1 oder CTLA-4 allein oder in Kombination essentiell für die Aufrechterhaltung der hepatisch induzierten Toleranz sind, sondern ihre Defizienz im verwendeten CRP-MBP Modell von weiteren, noch zu definierenden Mechanismen kompensiert werden kann, was das außergewöhnliche Potential der Leber als tolerogenes Organ verdeutlicht.

4.3 Ausblick

Für die weitere Untersuchung von Mechanismen der hepatischen Immuntoleranz ergeben sich verschiedene Ansatzpunkte. Zum einen erscheint es sinnvoll, die Rolle von CTLA-4 und PD-1 als koinhibitorische Oberflächenmoleküle tiefergehend zu beleuchten. Hier sollte die Effizienz der Antikörper-Depletion überprüft und gegebenenfalls verbessert werden; darüber hinaus wäre das Einkreuzen von CTLA-4- bzw. PD-1-knockout-Mäusen in die Mauslinie CRP-MBP x tg4 denkbar, ähnlich wie in anderen Modellen der Autoimmunität (Klocke et al. 2017; X. Chen et al. 2014), um die Relevanz der Koinhibitoren in unserem Modell noch in einer anderen Herangehensweise untersuchen zu können. Auch eine Interaktion von PD-L1 auf LSECs mit PD-1 auf CD4+ T-Zellen, wie sie von Diehl et al. analog mit CD8+ T-Zellen beschrieben wurde (Diehl et al. 2008), wäre als hepatischer Toleranzmechanismus plausibel und sollte weiter untersucht werden. Eine weitere Analyse könnte darüber hinaus bezüglich der Zellinteraktion bzw. -rezeptoren wie CXCL9 und CXCR3 erfolgen, die in verschiedenen Studien als essentiell für die T-Zell-Infiltration und Regulierung der Immunantwort in der Leber hinsichtlich der Toleranzentwicklung beschrieben wurden (Erhardt et al. 2011; K. Neumann et al. 2015; Z. Zeng et al. 2016).

Zum anderen sollen die Rolle von IL-6, IL-27 und die Hemmung weiterer Oberflächenantigene wie z.B. Lag-3, TIM-3 oder TIGIT, denen wichtige inhibitorische Eigenschaften zugeschrieben werden (Anderson et al. 2016; Le Mercier et al. 2015), mit verschiedenen Methoden betrachtet werden. Hierfür planen wir eine Kreuzung der Mauslinien CRP-MBP x hCD2-ΔKtβR II x tg4 und CRP-MBP x cd4-DN-IL10R x tg4, um CRP-MBP x dnTGFβR x dnIL10R

x tg4 Mäuse zu erhalten, die sowohl TGF- β - als auch IL-10-insensitive (doppelt dominant-negative) T-Zellen aufweisen. Die Verwendung der doppelt dominant-negativen CRP-MBP x dnTGF β R x dnIL10R x tg4 Mauslinie würde mittels der Applikation depletierender Antikörper *in vivo* die Untersuchung multipler Toleranzmechanismen erlauben, mit sowohl alleiniger als auch mit kombinierter Antikörper-Blockade.

Des Weiteren soll, zur genaueren Analyse der für die hepatische Toleranz verantwortlichen Gene, zum einen die Genexpressionsanalyse im Modell des adoptiven Transfers von tg4 CD4⁺ T-Zellen in immunisierte CRP-MBP x B10.PL Mäuse mit isolierten Leberlymphozyten – statt Gesamtlebergewebe – wiederholt und um weitere potentielle Genkandidaten wie z.B. TIM-3 oder TIGIT (Anderson et al. 2016) ergänzt werden. Zum anderen soll im Modell des adoptiven Transfers von MBP-spezifischen autoreaktiven CD4⁺ Spenderzellen aus der nicht-transgenen wt x tg4 Mauslinie in tolerante CRP-MBP x B10.PL Mäuse, im Vergleich zur nicht-transgenen B10.PL Kontrollgruppe, ein Microarray durchgeführt werden, der den parallelen Vergleich umfangreicher Genprofile erlaubt. So ließe sich die genetische Signatur der autoreaktiven, MBP-spezifischen tg4 CD4⁺ Spenderzellen mit ebendiesen Spenderzellen nach Transfer und Re-Isolation aus der Leber oder Milz von toleranten MBP-transgenen Mäusen oder suszeptiblen Wildtypen vergleichen. Gene, die dabei besonders hoch- oder herunterreguliert würden, wären mögliche Kandidaten für die induzierte Toleranz bzw. Suppression der autoreaktiven tg4 Zellen.

5. Zusammenfassung

Die Leber ist in der Lage, eine antigenspezifische T-Zell-Toleranz zu induzieren, wobei die Generierung von Regulatorischen T Zellen (Tregs) eine Rolle spielt (Lüth et al. 2008). In dieser Arbeit sollte die Bedeutung von Tregs und Tr1 Zellen bzw. IL-10 für die hepatische Immuntoleranz und den Schutz vor Autoimmunität untersucht werden. Wir verwendeten ein Mausmodell, in dem das Autoantigen Myelin Basisches Protein (MBP) ektopisch unter dem CRP-Promotor in der Leber exprimiert wird und in dem autoreaktive MBP-spezifische T-Zellen vorliegen (tg4). Obwohl die Funktionalität der autoreaktiven T-Effektorzellen in diesem Modell *in vitro* und *in vivo* bestätigt wurde, waren CRP-MBP x tg4 Mäuse vor der Induktion von Autoimmunität vollständig geschützt. Durch Gabe eines Treg-depletierenden Antikörpers oder durch Verwendung von Mäusen, deren periphere Treg-Induktion aufgrund eines dominant-negativen TGF- β -Rezeptors der T-Zellen eingeschränkt ist, wurde die Bedeutung der Tregs in diesem Modell untersucht. Weder bei Treg-Depletion durch Antikörper noch bei Verwendung der Mäuse mit gestörter Treg-Induktion kam es zur Auslösung von Autoimmunität. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Fehlen von Tregs allein nicht zur Durchbrechung der hepatischen Immuntoleranz führt.

Zur Untersuchung der Rolle von IL-10 für die Lebertoleranz verwendeten wir einen blockierenden IL-10-Rezeptor-Antikörper bzw. Mäuse, deren T-Zellen wegen eines dominant-negativen IL-10-Rezeptors insensitiv für IL-10 sind. Wir konnten zwar die Differenzierung von MBP-spezifischen CD4⁺ T-Zellen zu CD49b⁺Lag-3⁺ Tr1-ähnlichen Zellen in der Leber CRP-MBP transgener Mäuse beobachten, bei Blockade des IL-10-Signalweges blieb die hepatisch induzierte Toleranz jedoch erhalten; dies galt sogar bei simultaner Treg-Inhibition.

Zusätzliche Analysen zeigten eine hohe Expression der Koinhibitoren CTLA-4 und PD-1 auf den autoreaktiven T-Zellen nach Infiltration in die Leber, die zur Toleranz beitragen könnten. Die *in vivo* Blockade dieser Koinhibitoren löste jedoch keine Autoimmunität aus. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aufrechterhaltung hepatischer Toleranz trotz der Defizienz elementarer Mechanismen wie Tregs, IL-10 und Koinhibitoren weiter gewährleistet ist. Es müssen somit weitere redundante, noch näher zu definierende Mechanismen verantwortlich sein. Dies verdeutlicht das hohe tolerogene Potential der Leber.

6. Abstract

The liver is able to induce antigen-specific tolerance for which peripherally induced T regulatory cells (Tregs) are known to be important mediators (Lüth et al. 2008). Here, we investigated different tolerance mechanisms, namely Tregs, Tr1 cells or IL-10 and coinhibitory molecules. We used a mouse model that is characterised both by ectopic expression of the autoantigen myelin basic protein (MBP) in the liver and by the presence of autoreactive MBP-specific T cells due to a transgenic T cell receptor (tg4). The functionality of T effector cells in CRP-MBP x tg4 mice was confirmed *in vivo* and *in vitro*. CRP-MBP x tg4 mice were completely resistant to the induction of autoimmune inflammation. Treg impairment in these mice was induced either by application of a Treg depleting antibody, or by crossing with mice in which T cells feature a dominant-negative TGF- β receptor that prevents peripheral Treg induction. Moreover, the role of IL-10 for the maintenance of hepatic tolerance was assessed in mice in which T cells are insensitive to IL-10 or by administering IL10R-antibody to CRP-MBP x tg4 mice. Neither Treg depletion with antibody nor Treg impairment in mice

with dominant-negative TGF- β receptor precipitated autoimmune inflammation. Upon adoptive transfer into CRP-MBP mice, MBP-specific CD4⁺ T cells differentiated into CD49b⁺Lag-3⁺ Tr1-like cells. However, impairment of IL-10 signaling did not lead to autoimmune inflammation. Even simultaneous abrogation of Treg and IL-10 signaling did not result in autoimmune inflammation. Additional analysis showed a high expression of CTLA-4 and PD-1 in livers of CRP-MBP x tg4 mice suggesting a role for these coinhibitory molecules for the maintenance of hepatic tolerance. However, tolerance persisted in spite of their solitary or combined blockade with antibodies. Our findings show that redundant, but partly undefined tolerance mechanisms safeguard the maintenance of hepatic tolerance even in conditions of Treg, IL-10 and coinhibitory receptor impairment.

7. Abkürzungsverzeichnis

AhR	Arylhydrocarbon-Rezeptor
AIH	Autoimmune Hepatitis
AK	Antikörper
ALT	Alanin-Aminotransferase
APC	Antigenpräsentierende Zelle
Blimp-1	B lymphocyte-induced maturation protein 1
BSA	Bovines Serumalbumin
c-Maf	Protoonkogen Avian Musculoaponeurotic Fibrosarcoma
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankung
CFA	Komplettes Freundsches Adjuvans
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
ConA	Concavalin A
CRP	C-reaktives Protein
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen 4
CXCL	Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand
DC	Dendritische Zelle
DEREG	Depletion of Regulatory T Cells
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
Egr-2	Early growth response protein 2
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetales Kälberserum
Foxp3	Forkhead-Box-Protein 3
FSC-A	Forward scatter – area
FSC-H	Forward scatter – height
GARP	Glycoprotein A repetitions predominant
GFP	Green Fluorescent Protein
GITR	Glucocorticoid-inducible tumor necrosis factor receptor
GM-CSF	Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor
Gzmb	Granzym B
HCV	Hepatitis C-Virus
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
ICOS	Inducible T cell CoStimulator
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-10R	IL-10-Rezeptor
ILT	Immunoglobulin-like transcript
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IPEX	Immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome
IRF4	Interferonregulierender Faktor 4
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
iTreg	Induzierte regulatorische T-Zelle
ITSM	Immunoreceptor tyrosine-based switch motif
Jak	Janus-Kinase
KC	Kupfferzelle
Ko	Knockout
Lag-3	Lymphocyte-activation gene 3
LAP	Latency-Associated Peptide
LSEC	Sinusoidale Endothelzelle der Leber
LTBP	Latent TGF- β binding protein
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MAPK	Mitogen-activated protein kinases

MBP	Myelin Basisches Protein
mDC	Myeloide Dendritische Zelle
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
mHAI	Modifizierter histologischer Aktivitätsindex
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: major histocompatibility complex)
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
mTor	Mammalian target of rapamycin
NFκB	Nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B cells
NK	Natürliche Killer (-Zelle)
NPC	Nichtparenchymatöse Zelle
nTreg	Natürliche regulatorische T-Zelle
PacO-NHS	Pacific Orange Succinimidyl Ester
PBS	Phosphate Buffered Saline
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L	Programmed death-ligand
pDC	Plasmacytoide Dendritische Zelle
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PK	Proteinkinase
PLP	Proteolipidprotein
PP2A	Proteinphosphatase 2
Prdm1	PR domain zinc finger protein 1
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RFP	Red Fluorescent Protein
RT	Raumtemperatur
rt-qPCR	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
SEM	Standard Error of the Mean; Standardfehler des Mittelwertes
SHP	Protein-Tyrosin-Phosphatase (Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1)
SSC-A	Sideward scatter – area
STAT	Signal transducers and activators of transcription
T-bet	T-box transcription factor TBX21
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCR	T Zell-Rezeptor
Teff	T-Effektorzellen CD4+CD25-
TGF-β	Transforming growth factor-β
TGF-βR	Transforming growth factor-β-Rezeptor
Th	T Helferzelle
TIGIT	T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains
TIM-3	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
Tr1	Typ 1 regulatorische Zelle CD4+Foxp3-
Treg	T regulatorische Zelle CD4+CD25+Foxp3+
Tyk	Tyrosin-Kinase
wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

8. Literaturverzeichnis

- Abbas, A.K., Murphy, K.M. & Sher, A., 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383(6603), pp.787–793.
- Akdis, M. et al., 2004. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *Journal of Experimental Medicine*, 199(11), pp.1567–1575.
- Alegre, M.L. et al., 1996. Regulation of surface and intracellular expression of CTLA4 on mouse T cells. *The Journal of Immunology*, 157(11), pp.4762–4770.
- an Haack, I. et al., 2015. The Role of Regulatory CD4 T Cells in Maintaining Tolerance in a Mouse Model of Autoimmune Hepatitis L. Graca, ed. *PloS one*, 10(11), pp.e0143715–16.
- Anderson, A.C., Joller, N. & Kuchroo, V.K., 2016. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. pp.1–16.
- Andersson, J. et al., 2008. CD4⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-beta-dependent manner. *The Journal of experimental medicine*, 205(9), pp.1975–1981.
- Andrade, Z.A., 2009. Schistosomiasis and liver fibrosis. *Parasite Immunology*, 31(11), pp.656–663.
- Annes, J.P., Munger, J.S. & Rifkin, D.B., 2003. Making sense of latent TGFbeta activation. *Journal of cell science*, 116(Pt 2), pp.217–224.
- Ansari, M.J.I. et al., 2003. The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *Journal of Experimental Medicine*, 198(1), pp.63–69.
- Apetoh, L. et al., 2010. The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nature Publishing Group*, 11(9), pp.854–861.
- Awasthi, A. et al., 2007. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nature Publishing Group*, 8(12), pp.1380–1389.
- Bacchetta, R. et al., 2002. Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines. *European Journal of Immunology*, 32(8), pp.2237–2245.
- Bacchetta, R. et al., 2014. Immunological Outcome in Haploidentical-HSC Transplanted Patients Treated with IL-10-Anergized Donor T Cells. *Frontiers in immunology*, 5, p.16.
- Bakdash, G. et al., 2013. The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal II. *Frontiers in immunology*, 4, p.53.
- Bamboas, Z.M. et al., 2009. Human liver dendritic cells promote T cell hyporesponsiveness. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(4), pp.1901–1911.
- Barrat, F.J. et al., 2002. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *Journal of Experimental Medicine*, 195(5),

pp.603–616.

- Becher, B., Durell, B.G. & Noelle, R.J., 2003. IL-23 produced by CNS-resident cells controls T cell encephalitogenicity during the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Clinical Investigation*, 112(8), pp.1186–1191.
- Benkhart, E.M. et al., 2000. Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression. *The Journal of Immunology*, 165(3), pp.1612–1617.
- Bennett, F. et al., 2003. Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses. *The Journal of Immunology*, 170(2), pp.711–718.
- Bertolino, P., Trescol-Biémont, M.-C. & Rabourdin-Combe, C., 1998. Hepatocytes induce functional activation of naive CD8. *European Journal of Immunology*, pp.1–16.
- Bettelli, E. et al., 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441(7090), pp.235–238.
- Bilate, A.M. & Lafaille, J.J., 2012. Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance. *Annual Review of Immunology*, 30, pp.733–758.
- Bouabe, H., 2012. Cytokine reporter mice: the special case of IL-10. *Scandinavian Journal of Immunology*, 75(6), pp.553–567.
- Bruniquel, D. et al., 1998. Regulation of expression of the human lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) molecule, a ligand for MHC class II. *Immunogenetics*, 48(2), pp.116–124.
- Brunkow, M.E. et al., 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature genetics*, 27(1), pp.68–73.
- Buchbinder, E.I. & Desai, A., 2016. CTLA-4 and PD-1 Pathways. *American Journal of Clinical Oncology*, 39(1), pp.98–106.
- Burchill, M.A. et al., 2007. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *The Journal of Immunology*, 178(1), pp.280–290.
- Callery, M.P., Kamei, T. & Flye, M.W., 1989. The effect of portacaval shunt on delayed-hypersensitivity responses following antigen feeding. *The Journal of surgical research*, 46(4), pp.391–394.
- Calne, R.Y., Sells, R.A., et al., 1969. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature*, 223(5205), pp.472–476.
- Calne, R.Y., White, H.J., et al., 1969. Immunosuppressive effects of the orthotopically transplanted porcine liver. *Transplantation proceedings*, 1(1), pp.321–324.
- Camisaschi, C. et al., 2010. LAG-3 expression defines a subset of CD4(+)CD25(high)Foxp3(+) regulatory T cells that are expanded at tumor sites. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(11), pp.6545–6551.
- Campbell, D.J. & Koch, M.A., 2011. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nature Reviews Immunology*, 11(2), pp.119–130.

- Cantor, H.M. & Dumont, A.E., 1967. Hepatic suppression of sensitization to antigen absorbed into the portal system. *Nature*, 215(5102), pp.744–745.
- Carambia, A. et al., 2015. Nanoparticle-based autoantigen delivery to Treg-inducing liver sinusoidal endothelial cells enables control of autoimmunity in mice. *Journal of Hepatology*, pp.1–32.
- Carambia, A. et al., 2014. TGF- β -dependent induction of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs by liver sinusoidal endothelial cells. *Journal of Hepatology*, 61(3), pp.594–599.
- Cerny, A. & Chisari, F.V., 1999. Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence. *Hepatology*, 30(3), pp.595–601.
- Chaudhry, A. et al., 2009. CD4⁺ Regulatory T Cells Control TH17 Responses in a Stat3-Dependent Manner. *Science*, 326(5955), pp.986–991.
- Chemnitz, J.M. et al., 2004. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *The Journal of Immunology*, 173(2), pp.945–954.
- Chen, L. & Flies, D.B., 2013. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology*, 13(4), pp.227–242.
- Chen, W. et al., 2003. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *Journal of Experimental Medicine*, 198(12), pp.1875–1886.
- Chen, X. et al., 2014. PD-1 regulates extrathymic regulatory T-cell differentiation. *European Journal of Immunology*, 44(9), pp.2603–2616.
- Chisari, F.V. & Ferrari, C., 1995. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annual Review of Immunology*, 13(1), pp.29–60.
- Cobbold, S.P. et al., 2010. Connecting the mechanisms of T-cell regulation: dendritic cells as the missing link. *Immunological Reviews*, 236(1), pp.203–218.
- Collison, L.W. et al., 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 450(7169), pp.566–569.
- Compston, A. & Coles, A., 2008. Multiple sclerosis. *The Lancet*, 372(9648), pp.1502–1517.
- Constantinescu, C.S. et al., 2011. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *British Journal of Pharmacology*, 164(4), pp.1079–1106.
- Couper, K.N., Blount, D.G. & Riley, E.M., 2008. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *The Journal of Immunology*, 180(9), pp.5771–5777.
- Crawford, A. et al., 2014. Molecular and transcriptional basis of CD4⁺ T cell dysfunction during chronic infection. *Immunity*, 40(2), pp.289–302.
- Crispe, I.N., 2014. Immune tolerance in liver disease. *Hepatology*, 60(6), pp.2109–2117.
- Crispe, I.N., 2011. Liver antigen-presenting cells. *Journal of Hepatology*, 54(2), pp.357–365.

- Cua, D.J. et al., 2003. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, 421(6924), pp.744–748.
- Curotto de Lafaille, M.A. & Lafaille, J.J., 2009. Natural and adaptive foxp3⁺ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity*, 30(5), pp.626–635.
- Dariavach, P. et al., 1988. Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. *European Journal of Immunology*, 18(12), pp.1901–1905.
- Derynck, R. et al., 1985. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature*, 316(6030), pp.701–705.
- Di Marco, R. et al., 1999. Concanavalin A-induced hepatitis in mice is prevented by interleukin (IL)-10 and exacerbated by endogenous IL-10 deficiency. *Autoimmunity*, 31(2), pp.75–83.
- Diehl, L. et al., 2008. Tolerogenic maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7-homolog 1-dependent CD8⁺ T cell tolerance. *Hepatology*, 47(1), pp.296–305.
- Dong, C. & Nurieva, R.I., 2003. Regulation of immune and autoimmune responses by ICOS. *Journal of Autoimmunity*, 21(3), pp.255–260.
- Dubois, C.M. et al., 1995. Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *The Journal of biological chemistry*, 270(18), pp.10618–10624.
- Dunham, R.M. et al., 2013. Hepatic stellate cells preferentially induce Foxp3⁺ regulatory T cells by production of retinoic acid. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 190(5), pp.2009–2016.
- Edwards, J.P. et al., 2013. Regulation of the Expression of GARP/Latent TGF- 1 Complexes on Mouse T Cells and Their Role in Regulatory T Cell and Th17 Differentiation. *The Journal of Immunology*, 190(11), pp.5506–5515.
- Edwards, L.J. & Constantinescu, C.S., 2004. A prospective study of conditions associated with multiple sclerosis in a cohort of 658 consecutive outpatients attending a multiple sclerosis clinic. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 10(5), pp.575–581.
- Erhardt, A. & Tiegs, G., 2010. Tolerance Induction in Response to Liver Inflammation. *Digestive Diseases*, 28(1), pp.86–92.
- Erhardt, A. et al., 2011. CXCR3 deficiency exacerbates liver disease and abrogates tolerance in a mouse model of immune-mediated hepatitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 186(9), pp.5284–5293.
- Erhardt, A. et al., 2007. IL-10, regulatory T cells, and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver injury in mice. *Hepatology*, 45(2), pp.475–485.
- Fahlén, L. et al., 2005. T cells that cannot respond to TGF- β escape control by CD4⁺CD25⁺regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 201(5), pp.737–746.
- Fairchild, P.J. et al., 1993. An autoantigenic T cell epitope forms unstable complexes with class II MHC: a novel route for escape from tolerance induction. *International immunology*, 5(9), pp.1151–1158.

- Fife, B.T. & Bluestone, J.A., 2008. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunological Reviews*, 224(1), pp.166–182.
- Fife, B.T. & Pauken, K.E., 2011. The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1217(1), pp.45–59.
- Fiorentino, D.F., Bond, M.W. & Mosmann, T.R., 1989. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *Journal of Experimental Medicine*, 170(6), pp.2081–2095.
- Floess, S. et al., 2007. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. P. Marrack, ed. *PLoS biology*, 5(2), p.e38.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A. & Rudensky, A.Y., 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nature Immunology*, 4(4), pp.330–336.
- Francisco, L.M. et al., 2009. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine*, 206(13), pp.3015–3029.
- Francisco, L.M., Sage, P.T. & Sharpe, A.H., 2010. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunological Reviews*, 236(1), pp.219–242.
- Freeman, G.J. et al., 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *Journal of Experimental Medicine*, 192(7), pp.1027–1034.
- Furtado, G.C. et al., 2002. Interleukin 2 signaling is required for CD4⁺ regulatory T cell function. *Journal of Experimental Medicine*, 196(6), pp.851–857.
- Gagliani, N. et al., 2013. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nature Medicine*, 19(6), pp.739–746.
- Gao, J.F. et al., 2011. Regulation of antigen-expressing dendritic cells by double negative regulatory T cells. *European Journal of Immunology*, 41(9), pp.2699–2708.
- Gleizes, P.E. et al., 1996. Identification and characterization of an eight-cysteine repeat of the latent transforming growth factor-beta binding protein-1 that mediates bonding to the latent transforming growth factor-beta1. *The Journal of biological chemistry*, 271(47), pp.29891–29896.
- Gondek, D.C. et al., 2005. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *The Journal of Immunology*, 174(4), pp.1783–1786.
- Gorelik, L. & Flavell, R.A., 2002. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nature Reviews Immunology*, 2(1), pp.46–53.
- Grabie, N. et al., 2007. Endothelial programmed death-1 ligand 1 (PD-L1) regulates CD8⁺ T-cell mediated injury in the heart. *Circulation*, 116(18), pp.2062–2071.
- Gregori, S. et al., 2010. Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood*, 116(6), pp.935–944.
- Gregori, S., Goudy, K.S. & Roncarolo, M.-G., 2012. The cellular and molecular mecha-

- nisms of immuno-suppression by human type 1 regulatory T cells. *Frontiers in immunology*, 3, p.30.
- Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Barchet, W., et al., 2004. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*, 21(4), pp.589–601.
- Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Tollefsen, B.L., et al., 2004. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood*, 104(9), pp.2840–2848.
- Groux, H. et al., 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, 389(6652), pp.737–742.
- Harrington, L.E. et al., 2005. Interleukin 17–producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology*, 6(11), pp.1123–1132.
- Herkel, J. et al., 2003. MHC class II-expressing hepatocytes function as antigen-presenting cells and activate specific CD4 T lymphocytes. *Hepatology*, 37(5), pp.1079–1085.
- Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S., 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299(5609), pp.1057–1061.
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), 2008. Refining genetic associations in multiple sclerosis. *The Lancet. Neurology*, 7(7), pp.567–569.
- Ishak, K. et al., 1995. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of Hepatology*, 22(6), pp.696–699.
- Ishida, Y. et al., 1992. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO journal*, 11(11), pp.3887–3895.
- Ivanov, I.I. et al., 2006. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*, 126(6), pp.1121–1133.
- Iwasaki, Y. et al., 2013. Egr-2 transcription factor is required for Blimp-1-mediated IL-10 production in IL-27-stimulated CD4+ T cells. *European Journal of Immunology*, 43(4), pp.1063–1073.
- Jankovic, D. et al., 2007. Conventional T-bet(+)Foxp3(–) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *Journal of Experimental Medicine*, 204(2), pp.273–283.
- Jäger, A. & Kuchroo, V.K., 2010. Effector and Regulatory T-cell Subsets in Autoimmunity and Tissue Inflammation. *Scandinavian Journal of Immunology*, 72(3), pp.173–184.
- Jin, J.-O., Han, X. & Yu, Q., 2013. Interleukin-6 induces the generation of IL-10-producing Tr1 cells and suppresses autoimmune tissue inflammation. *Journal of Autoimmunity*, 40(C), pp.28–44.
- Josefowicz, S.Z. & Rudensky, A., 2009. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity*, 30(5), pp.616–625.
- Kafri, R., Springer, M. & Pilpel, Y., 2009. Genetic redundancy: new tricks for old genes.

Cell, 136(3), pp.389–392.

Kamanaka, M. et al., 2006. Expression of interleukin-10 in intestinal lymphocytes detected by an interleukin-10 reporter knockin tiger mouse. *Immunity*, 25(6), pp.941–952.

Kamanaka, M. et al., 2011. Memory/effector (CD45RB^{lo}) CD4 T cells are controlled directly by IL-10 and cause IL-22-dependent intestinal pathology. *Journal of Experimental Medicine*, 208(5), pp.1027–1040.

Kappler, J.W., Roehm, N. & Marrack, P., 1987. T Cell Tolerance by Clonal Elimination in the Thymus. *Cell*, 49, pp.273–280.

Karandikar, N.J. et al., 1996. CTLA-4: a negative regulator of autoimmune disease. *Journal of Experimental Medicine*, 184(2), pp.783–788.

Keir, M.E. et al., 2008. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annual Review of Immunology*, 26, pp.677–704.

Keir, M.E. et al., 2006. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *Journal of Experimental Medicine*, 203(4), pp.883–895.

Khatttri, R. et al., 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nature Immunology*, 4(4), pp.337–342.

Kido, M. et al., 2008. Fatal autoimmune hepatitis induced by concurrent loss of naturally arising regulatory T cells and PD-1-mediated signaling. *Gastroenterology*, 135(4), pp.1333–1343.

Klocke, K., Holmdahl, R. & Wing, K., 2017. CTLA-4 expressed by FOXP3+ regulatory T cells prevents inflammatory tissue attack and not T-cell priming in arthritis. *Immunology*, 152(1), pp.125–137.

Kohm, A.P. et al., 2006. Cutting Edge: Anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells. *The Journal of Immunology*, 176(6), pp.3301–3305.

Kohm, A.P. et al., 2002. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, 169(9), pp.4712–4716.

Korn, T. et al., 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology*, 27(1), pp.485–517.

Korn, T. et al., 2007. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Seminars in Immunology*, 19(6), pp.362–371.

Krummel, M.F. & Allison, J.P., 1995. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *Journal of Experimental Medicine*, 182(2), pp.459–465.

Kruse, N. et al., 2009. Priming of CD4+ T cells by liver sinusoidal endothelial cells induces CD25^{low} forkhead box protein 3- regulatory T cells suppressing autoimmune hepatitis. *Hepatology*, 50(6), pp.1904–1913.

Kulkarni, A.B. et al., 1993. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences*, 90(2), pp.770–774.
- Kühn, R. et al., 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, 75(2), pp.263–274.
- Lahl, K. & Sparwasser, T., 2011. In vivo depletion of FoxP3⁺ Tregs using the DEREK mouse model. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 707(3), pp.157–172.
- Langrish, C.L. et al., 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 201(2), pp.233–240.
- Laschtowitz, A., 2018. *Mechanismen zur Auslösung von Autoimmunität in der Leber*. Med. Dissertation. Universität Hamburg.
- Le Mercier, I., Lines, J.L. & Noelle, R.J., 2015. Beyond CTLA-4 and PD-1, the Generation Z of Negative Checkpoint Regulators. *Frontiers in immunology*, 6(1), pp.3–15.
- Li, F. & Tian, Z., 2013. The liver works as a school to educate regulatory immune cells. *Cellular & molecular immunology*, 10(4), pp.292–302.
- Li, M.O. & Flavell, R.A., 2008a. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Immunity*, 28(4), pp.468–476.
- Li, M.O. & Flavell, R.A., 2008b. TGF- β : A Master of All T Cell Trades. *Cell*, 134(3), pp.392–404.
- Li, M.O., Sanjabi, S. & Flavell, R.A., 2006. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity*, 25(3), pp.455–471.
- Li, M.O., Wan, Y.Y., et al., 2006. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annual Review of Immunology*, 24(1), pp.99–146.
- Li, W. et al., 2006. Anti-CD25 mAb Administration Prevents Spontaneous Liver Transplant Tolerance. *Transplantation proceedings*, 38(10), pp.3207–3208.
- Li, Y. et al., 2015. Hepatic Stellate Cells Inhibit T Cells through Active TGF- β 1 from a Cell Surface-Bound Latent TGF- β 1/GARP Complex. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 195(6), pp.2648–2656.
- Liang, S. et al., 2005. Conversion of CD4⁺CD25⁻ cells into CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in vivo requires B7 costimulation, but not the thymus. *Journal of Experimental Medicine*, 201(1), pp.127–137.
- Liang, S.C. et al., 2003. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *European Journal of Immunology*, 33(10), pp.2706–2716.
- Lin, M.-H. et al., 2013. B lymphocyte-induced maturation protein 1 (BLIMP-1) attenuates autoimmune diabetes in NOD mice by suppressing Th1 and Th17 cells. *Diabetologia*, 56(1), pp.136–146.
- Lin, M.-H. et al., 2014. T cell-specific BLIMP-1 deficiency exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis in nonobese diabetic mice by increasing Th1 and Th17 cells. *Clinical Immunology*, 151(2), pp.101–113.
- Linsley, P.S. et al., 1996. Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards

- sites of TCR engagement. *Immunity*, 4(6), pp.535–543.
- Liu, G.Y. et al., 1995. Low avidity recognition of self-antigen by T cells permits escape from central tolerance. *Immunity*, 3(4), pp.407–415.
- Liu, Y. et al., 2008. A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nature Publishing Group*, 9(6), pp.632–640.
- Lublin, F.D. & Reingold, S.C., 1996. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*, 46(4), pp.907–911.
- Lüth, S. et al., 2008. Ectopic expression of neural autoantigen in mouse liver suppresses experimental autoimmune neuroinflammation by inducing antigen-specific Tregs. *Journal of Clinical Investigation*, 118(10), pp.3403–3410.
- Manavalan, J.S. et al., 2003. High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. *Transplant immunology*, 11(3-4), pp.245–258.
- Mandapathil, M. et al., 2010. Adenosine and prostaglandin E2 cooperate in the suppression of immune responses mediated by adaptive regulatory T cells. *The Journal of biological chemistry*, 285(36), pp.27571–27580.
- Marie, J.C., Liggitt, D. & Rudensky, A.Y., 2006. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity*, 25(3), pp.441–454.
- Massagué, J. & Gomis, R.R., 2006. The logic of TGFbeta signaling. *FEBS letters*, 580(12), pp.2811–2820.
- Masteller, E.L. et al., 2000. Structural analysis of CTLA-4 function in vivo. *The Journal of Immunology*, 164(10), pp.5319–5327.
- Maynard, C.L. et al., 2007. Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nature Immunology*, 8(9), pp.931–941.
- McFarland, H.F. & Martin, R., 2007. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nature Immunology*, 8(9), pp.913–919.
- Meeson, A.P. et al., 1994. The distribution of inflammatory demyelinated lesions in the central nervous system of rats with antibody-augmented demyelinating experimental allergic encephalomyelitis. *Experimental neurology*, 129(2), pp.299–310.
- Meiron, M. et al., 2008. CXCL12 (SDF-1alpha) suppresses ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis by selecting antigen-specific regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine*, 205(11), pp.2643–2655.
- Moore, K.W. et al., 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology*, 19(1), pp.683–765.
- Mosmann, T.R. & Coffman, R.L., 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology*, 7, pp.145–173.

- Mosmann, T.R. et al., 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology*, 136(7), pp.2348–2357.
- Mosser, D.M. & Zhang, X., 2008. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunological Reviews*, 226(1), pp.205–218.
- Murakami, N. & Riella, L.V., 2014. Co-inhibitory pathways and their importance in immune regulation. *Transplantation*, 98(1), pp.3–14.
- Murphy, K.M. & Reiner, S.L., 2002. The lineage decisions of helper T cells. *Nature Reviews Immunology*, 2(12), pp.933–944.
- Nakamoto, N. et al., 2009. Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade. M. Gale, ed. *PLoS pathogens*, 5(2), p.e1000313.
- Neumann, C. et al., 2014. Role of Blimp-1 in programing Th effector cells into IL-10 producers. *The Journal of experimental medicine*, 211(9), pp.1807–1819.
- Neumann, K. et al., 2015. Chemokine Transfer by Liver Sinusoidal Endothelial Cells Contributes to the Recruitment of CD4+ T Cells into the Murine Liver. R. Lutter, ed. *PloS one*, 10(6), p.e0123867.
- Nishimura, H. et al., 1999. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*, 11(2), pp.141–151.
- Nowak, M.A. et al., 1997. Evolution of genetic redundancy. *Nature*, 388(6638), pp.167–171.
- O'Garra, A. et al., 2004. IL-10–producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. *Journal of Clinical Investigation*, 114(10), pp.1372–1378.
- Oderup, C. et al., 2006. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology*, 118(2), pp.240–249.
- Ohkura, N., Kitagawa, Y. & Sakaguchi, S., 2013. Development and Maintenance of Regulatory T cells. *Immunity*, 38(3), pp.414–423.
- Okamura, T. et al., 2012. Roles of LAG3 and EGR2 in regulatory T cells. *Annals of the rheumatic diseases*, 71 Suppl 2(Suppl 2), pp.i96–100.
- Okazaki, T. et al., 2001. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphorylate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(24), pp.13866–13871.
- Olitsky, P.K. & Yager, R.H., 1949. Experimental disseminated encephalomyelitis in white mice. *Journal of Experimental Medicine*, 90(3), pp.213–224.
- Ouyang, W. et al., 2010. Transforming Growth Factor- β ; Signaling Curbs Thymic Negative Selection Promoting Regulatory T Cell Development. *Immunity*, 32(5), pp.642–653.
- O'Shea, J.J. & Murray, P.J., 2008. Cytokine Signaling Modules in Inflammatory Responses. *Immunity*, 28(4), pp.477–487.

- Pandiyan, P. et al., 2007. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nature Publishing Group*, 8(12), pp.1353–1362.
- Parry, R.V. et al., 2005. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Molecular and cellular biology*, 25(21), pp.9543–9553.
- Paterson, A.M. et al., 2015. Deletion of CTLA-4 on regulatory T cells during adulthood leads to resistance to autoimmunity. *Journal of Experimental Medicine*, 212(10), pp.1603–1621.
- Pflanz, S. et al., 2002. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4+ T cells. *Immunity*, 16(6), pp.779–790.
- Polansky, J.K. et al., 2008. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *European Journal of Immunology*, 38(6), pp.1654–1663.
- Pot, C. et al., 2009. Cutting edge: IL-27 induces the transcription factor c-Maf, cytokine IL-21, and the costimulatory receptor ICOS that coordinately act together to promote differentiation of IL-10-producing Tr1 cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(2), pp.797–801.
- Qureshi, O.S. et al., 2011. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science*, 332(6029), pp.600–603.
- Rakoff-Nahoum, S., Hao, L. & Medzhitov, R., 2006. Role of toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis. *Immunity*, 25(2), pp.319–329.
- Rani, A. et al., 2011. IL-2 regulates expression of C-MAF in human CD4 T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187(7), pp.3721–3729.
- Read, S., Malmström, V. & Powrie, F., 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 192(2), pp.295–302.
- Rivers, T.M. & Schwentker, F.F., 1935. ENCEPHALOMYELITIS ACCOMPANIED BY MYELIN DESTRUCTION EXPERIMENTALLY PRODUCED IN MONKEYS. *Journal of Experimental Medicine*, 61(5), pp.689–702.
- Robinson, A.P. et al., 2014. *The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment* 1st ed., Elsevier B.V.
- Rodig, N. et al., 2003. Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8+ T cell activation and cytotoxicity. *European Journal of Immunology*, 33(11), pp.3117–3126.
- Romo-Tena, J., Gómez-Martín, D. & Alcocer-Varela, J., 2013. CTLA-4 and autoimmunity: new insights into the dual regulator of tolerance. *Autoimmunity Reviews*, 12(12), pp.1171–1176.
- Roncarolo, M.-G. et al., 2006. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunological Reviews*, 212(1), pp.28–50.
- Roncarolo, M.-G. et al., 2014. Tr1 Cells and the Counter-Regulation of Immunity: Natural Mechanisms and Therapeutic Applications. In S. Fillatreau & A. O'Garra, eds. *Interleukin-10 in Health and Disease*. Current Topics in Microbiology and Immunology.

- Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 39–68.
- Roncarolo, M.-G. et al., 2001. Type 1 T regulatory cells. *Immunological Reviews*, 182(1), pp.68–79.
- Rubtsov, Y.P. et al., 2008. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity*, 28(4), pp.546–558.
- Saharinen, J. & Keski-Oja, J., 2000. Specific sequence motif of 8-Cys repeats of TGF-beta binding proteins, LTBP, creates a hydrophobic interaction surface for binding of small latent TGF-beta. *Molecular biology of the cell*, 11(8), pp.2691–2704.
- Saharinen, J., Taipale, J. & Keski-Oja, J., 1996. Association of the small latent transforming growth factor-beta with an eight cysteine repeat of its binding protein LTBP-1. *The EMBO journal*, 15(2), pp.245–253.
- Sakaguchi, S., 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature Immunology*, 6(4), pp.345–352.
- Sakaguchi, S. & Sakaguchi, N., 1990. Thymus and autoimmunity: capacity of the normal thymus to produce pathogenic self-reactive T cells and conditions required for their induction of autoimmune disease. *Journal of Experimental Medicine*, 172(2), pp.537–545.
- Sakaguchi, S. et al., 1995. 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. *The Journal of Immunology*, 155(3), pp.1151–1164.
- Sakaguchi, S. et al., 1985. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *Journal of Experimental Medicine*, 161(1), pp.72–87.
- Sakaguchi, S. et al., 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 133(5), pp.775–787.
- Salama, A.D. et al., 2003. Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Experimental Medicine*, 198(1), pp.71–78.
- Sanjabi, S. et al., 2009. Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Current opinion in pharmacology*, 9(4), pp.447–453.
- Sauer, S. et al., 2008. T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(22), pp.7797–7802.
- Schmetterer, K.G. et al., 2015. STAT3 governs hyporesponsiveness and granzyme B-dependent suppressive capacity in human CD4+ T cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 29(3), pp.759–771.
- Sellon, R.K. et al., 1998. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infection and Immunity*, 66(11), pp.5224–5231.

- Setoguchi, R. et al., 2005. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *Journal of Experimental Medicine*, 201(5), pp.723–735.
- Sharpe, A.H. et al., 2007. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nature Immunology*, 8(3), pp.239–245.
- Shevach, E.M., 2009. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*, 30(5), pp.636–645.
- Shi, Y. & Massagué, J., 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113(6), pp.685–700.
- Shipkova, M. & Wieland, E., 2012. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 413(17-18), pp.1338–1349.
- Shull, M.M. et al., 1992. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*, 359(6397), pp.693–699.
- Singh, B. et al., 2013. Modulation of autoimmune diseases by interleukin (IL)-17 producing regulatory T helper (Th17) cells. *The Indian journal of medical research*, 138(5), pp.591–594.
- Sriram, S. et al., 1982. Identification of T cell subsets and B lymphocytes in mouse brain experimental allergic encephalitis lesions. *The Journal of Immunology*, 129(4), pp.1649–1651.
- Stephens, L.A., Malpass, K.H. & Anderton, S.M., 2009. Curing CNS autoimmune disease with myelin-reactive Foxp3+ Treg. *European Journal of Immunology*, 39(4), pp.1108–1117.
- Stumhofer, J.S. et al., 2007. Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nature Publishing Group*, 8(12), pp.1363–1371.
- t Hart, B.A., Hintzen, R.Q. & Laman, J.D., 2009. Multiple sclerosis – a response-to-damage model. *Trends in Molecular Medicine*, 15(6), pp.235–244.
- Tai, X. et al., 2012. Basis of CTLA-4 function in regulatory and conventional CD4(+) T cells. *Blood*, 119(22), pp.5155–5163.
- Takahashi, T. et al., 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *Journal of Experimental Medicine*, 192(2), pp.303–310.
- Tang, L. et al., 2009. Liver sinusoidal endothelial cell lectin, LSEctin, negatively regulates hepatic T-cell immune response. *Gastroenterology*, 137(4), pp.1498–508.e1–5.
- Thompson, C. & Powrie, F., 2004. Regulatory T cells. *Current opinion in pharmacology*, 4(4), pp.408–414.
- Thomson, A.W. & Knolle, P.A., 2010. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nature Reviews Immunology*, 10(11), pp.753–766.
- Tiegs, G. & Lohse, A.W., 2010. Immune tolerance: What is unique about the liver. *Journal of Autoimmunity*, 34(1), pp.1–6.

- Tsuji-Takayama, K. et al., 2008. The production of IL-10 by human regulatory T cells is enhanced by IL-2 through a STAT5-responsive intronic enhancer in the IL-10 locus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(6), pp.3897–3905.
- Vasanthakumar, A. & Kallies, A., 2013. IL-27 paves different roads to Tr1. *European Journal of Immunology*, 43(4), pp.882–885.
- Veldhoen, M. et al., 2006. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, 24(2), pp.179–189.
- Vieira, P.L. et al., 2004. IL-10-Secreting Regulatory T Cells Do Not Express Foxp3 but Have Comparable Regulatory Function to Naturally Occurring CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, 172(10), pp.5986–5993.
- Walker, L.S.K., 2013. Treg and CTLA-4: two intertwining pathways to immune tolerance. *Journal of Autoimmunity*, 45, pp.49–57.
- Walker, L.S.K. & Sansom, D.M., 2015. Confusing signals: Recent progress in CTLA-4 biology. *Trends in immunology*, 36(2), pp.63–70.
- Walunas, T.L. et al., 1994. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*, 1(5), pp.405–413.
- Wan, Y.Y. & Flavell, R.A., 2006. The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunological Reviews*, 212(1), pp.114–130.
- Wang, H.Y. & Wang, R.-F., 2007. Regulatory T cells and cancer. *Current Opinion in Immunology*, 19(2), pp.217–223.
- Waterhouse, P. et al., 1995. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science*, 270(5238), pp.985–988.
- Wei, H.-X. et al., 2008. CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells protect against T cell-mediated fulminant hepatitis in a TGF-beta-dependent manner in mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(10), pp.7221–7229.
- Weiner, H.L., 1997. Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunology today*, 18(7), pp.335–343.
- Weinhold, B. & Rüther, U., 1997. Interleukin-6-dependent and -independent regulation of the human C-reactive protein gene. *The Biochemical journal*, 327 (Pt 2)(Pt 2), pp.425–429.
- Wherry, E.J. & Kurachi, M., 2015. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature Reviews Immunology*, 15(8), pp.486–499.
- White, A.M. & Wraith, D.C., 2016. Tr1-Like T Cells - An Enigmatic Regulatory T Cell Lineage. *Frontiers in immunology*, 7, p.355.
- Wildin, R.S., Smyk-Pearson, S. & Filipovich, A.H., 2002. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *Journal of medical genetics*, 39(8), pp.537–545.
- Wing, K. et al., 2008. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*, 322(5899), pp.271–275.
- Wing, K., Yamaguchi, T. & Sakaguchi, S., 2011. Cell-autonomous and -non-autonomous

- roles of CTLA-4 in immune regulation. *Trends in immunology*, 32(9), pp.428–433.
- Xu, L. et al., 2013. Liver type I regulatory T cells suppress germinal center formation in HBV-tolerant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(42), pp.16993–16998.
- Yang, R. et al., 1994. Intestinal venous drainage through the liver is a prerequisite for oral tolerance induction. *Journal of pediatric surgery*, 29(8), pp.1145–1148.
- Yao, Y. et al., 2015. Tr1 Cells, but Not Foxp3+ Regulatory T Cells, Suppress NLRP3 Inflammasome Activation via an IL-10-Dependent Mechanism. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 195(2), pp.488–497.
- Ye, F. et al., 2009. Tr1 regulatory T cells induced by ConA pretreatment prevent mice from ConA-induced hepatitis. *Immunology letters*, 122(2), pp.198–207.
- Youngnak, P. et al., 2003. Differential binding properties of B7-H1 and B7-DC to programmed death-1. *Biochemical and biophysical research communications*, 307(3), pp.672–677.
- Zamvil, S. et al., 1985. T-cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing paralysis and demyelination. *Nature*, 317(6035), pp.355–358.
- Zamvil, S.S. et al., 1986. T-cell epitope of the autoantigen myelin basic protein that induces encephalomyelitis. *Nature*, 324(6094), pp.258–260.
- Zeng, H. et al., 2015. Type 1 regulatory T cells: a new mechanism of peripheral immune tolerance. *Cellular & molecular immunology*, 12(5), pp.566–571.
- Zeng, Z. et al., 2016. Interferon- γ facilitates hepatic antiviral T cell retention for the maintenance of liver-induced systemic tolerance. *The Journal of experimental medicine*, 213(6), pp.1079–1093.
- Zhang, H. et al., 2010. TGF-beta-induced myelin peptide-specific regulatory T cells mediate antigen-specific suppression of induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(12), pp.6629–6636.
- Zheng, S.G. et al., 2007. IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. *The Journal of Immunology*, 178(4), pp.2018–2027.
- Zheng, Y. et al., 2008. Acquisition of suppressive function by activated human CD4+CD25- T cells is associated with the expression of CTLA-4 not FoxP3. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(3), pp.1683–1691.
- Zhou, A.X. et al., 2013. GARP-TGF- Complexes Negatively Regulate Regulatory T Cell Development and Maintenance of Peripheral CD4+ T Cells In Vivo. *The Journal of Immunology*, 190(10), pp.5057–5064.
- Zhou, L. et al., 2008. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. *Nature*, 453(7192), pp.236–240.
- Zucchelli, S. et al., 2005. Defective central tolerance induction in NOD mice: genomics and genetics. *Immunity*, 22(3), pp.385–396.

9. Kongressbeiträge

32. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber - GASL, Düsseldorf 2016 – Posterbeitrag

Redundant tolerance mechanisms prevent autoimmune liver inflammation in mice.

Lisa Leypoldt, Alena Laschtowitz, Christoph Schramm, Samuel Huber, Ansgar W. Lohse, Antonella Carambia, Johannes Herkel.

Auszeichnung mit dem **Posterpreis** „Virushepatitis und Immunologie“ der GASL 2016.

International Liver Congress 2016 der European Association for the Study of the Liver (EASL) in Barcelona, Spanien – Posterbeitrag

Redundant tolerance mechanisms prevent autoimmune liver inflammation in mice.

Lisa Leypoldt, Alena Laschtowitz, Dorothee Schwinge, Christoph Schramm, Samuel Huber, Ansgar W. Lohse, Antonella Carambia, Johannes Herkel.

10. Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Ansgar W. Lohse für die Möglichkeit, diese Arbeit in der I. Medizinischen Klinik anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Johannes Herkel für die außerordentlich gute Betreuung, für sein großes Vertrauen und seine Hilfsbereitschaft in jeglicher Hinsicht. Auch danke ich ihm für die anregenden fachlichen Diskussionen und seine Ermutigung bei Rückschlägen.

Ebenso gilt mein ganz besonderer Dank Dr. Antonella Carambia für die ausgezeichnete Betreuung dieser Arbeit, die Einarbeitung und Hilfestellung im Labor, ihr Vertrauen sowie für ihren wertvollen fachlichen und persönlichen Rat. Außerdem danke ich ihr für ihre positive, humorvolle Art, die ich sehr zu schätzen gelernt habe.

Ich danke Angelika Schmidt und Marco Hilken für ihre technische Unterstützung und stetige Hilfsbereitschaft bei allen Schwierigkeiten des Laboralltages.

Mein weiterer Dank gilt dem gesamten Team unseres Labors für die ständige Hilfsbereitschaft, fachlichen Ratschläge sowie für die nette, freundschaftliche Atmosphäre, die das Arbeiten sehr angenehm gemacht hat.

Schließlich gilt mein Dank meinen Eltern Beatrix und Dietrich Leypoldt, meiner weiteren Familie sowie Simon Koch, die mich stets unterstützen und mir mit ihrem bedingungslosen Vertrauen in jeglicher Hinsicht Rückhalt geben.

11. Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

12. Eidesstattliche Erklärung

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

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

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

Unterschrift:
