

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

I. Medizinische Klinik und Poliklinik

Direktor: Prof. Dr. Ansgar W. Lohse

Mechanismen zur Auslösung von Autoimmunität in der Leber

Dissertation

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

vorgelegt von:

Alena Laschtowitz
aus Mettingen

Hamburg 2018

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 29.01.2019**

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

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Johannes Herkel

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. Thomas Jacobs

Inhaltsverzeichnis

1. Zielsetzung	6
2. Einleitung	7
2.1. Die Immunologie der Leber: zwischen Immunität und Toleranz	7
2.2. Autoimmune Erkrankungen der Leber	7
2.3. Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis: Mausmodell der Multiplen Sklerose	9
2.4. Antigen-präsentierende Zellen in der Leber	11
2.5. CD4+ T Zell Differenzierung	12
2.5.1. Regulatorische T Zellen	14
2.5.2. Typ 1 regulatorische T Zellen	15
2.6. Anti-inflammatorische Zytokine in der Leber: TGF- β und IL-10	17
2.7. Hepatische Toleranzinduktion im EAE-Mausmodell	19
3. Material und Methoden	21
3.1 Geräte	21
3.2. Materialien	22
3.3. Kits	24
3.4. Antikörper (AK) für die Durchflusszytometrie	25
3.5. Puffer	26
3.6. Versuchstiere	27
3.7. Software	28
3.8. Zellaufreinigung	28
3.8.1. Isolation von CD4+ T Lymphozyten aus der Milz	28
3.8.2. Isolation von CD4+CD25- und CD4+CD25+ T Lymphozyten aus der Milz	29
3.8.3. Isolation von CD3- Antigen-präsentierenden Zellen (APC)	29
3.8.4. Isolation von CD11c+ dendritischen Zellen (DC) aus der Milz	29
3.8.5. Isolation nicht-parenchymatöser Zellen (NPC) aus der Leber	30
3.9. Zellkultur	30
3.9.1. Zellzahlbestimmungen	30
3.9.2. Zellkulturmedien	31
3.9.3. Restimulation der Zellen zur Detektion von Zytokinen im Zellkulturüberstand	31
3.9.4. Restimulation für die intrazelluläre Zytokinfärbung	31
3.10. Zellcharakterisierung	32
3.10.1. Vitalitätstest	32
3.10.2. Färbung von Oberflächenmarkern	32

3.10.3. Färbung von intrazellulären Zytokinen	32
3.10.4. Färbung von CD4+CD25+Foxp3+ regulatorischen T Zellen	33
3.10.5. Färbung von CD49b+LAG-3+ Typ 1 regulatorischen T Zellen	33
3.10.6. Proliferationstest.....	33
3.10.7. <i>In vitro</i> Suppressionsassay	34
3.10.8. Durchflusszytometrie: Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS).....	35
3.10.9. Zytokinbestimmung im Zellkulturüberstand: Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	35
3.10.10. Bestimmung der absoluten CD4+ T Zellzahl in der Leber	36
3.11. Histologie.....	36
3.11.1. Fixation, Entwässerung und Paraffin-Einbettung	36
3.11.2. Hämatoxilin-Eosin-Färbung.....	37
3.12. Tierexperimentelle Arbeiten	37
3.12.1. Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis: MBP-Immunsierung	37
3.12.2. Beurteilung der EAE	38
3.12.3. Autoimmune Hepatitis im Mausmodell	38
3.12.4. Adoptiver Zelltransfer Antigen-spezifischer CD4+ T Zellen <i>in vivo</i>	39
3.12.5. <i>In vivo</i> Treg-Depletion mittels Injektion von anti-mouse-CD25 Antikörper (PC-61.5.3).....	39
3.12.6. IL-10-Rezeptor Blockade mittels Injektion von anti-IL-10-Rezeptor Antikörper...39	
3.13. Statistische Auswertungen	40
4. Ergebnisse	41
4.1. Charakterisierung des CRP-MBP x tg4 Mausmodells.....	41
4.1.1. Analyse von CRP-MBP x tg4 Mäusen ohne Vorbehandlung.....	41
4.1.2. Analyse von CRP-MBP x tg4 Mäusen nach MBP-Immunsierung	48
4.1.3. Rolle von Treg für die hepatische MBP-Toleranz	55
4.1.2. Rolle des Zytokins TGF- β und peripher induzierter Treg für die hepatische MBP-Toleranz.....	58
4.1.3. Rolle des Zytokins IL-10 für die hepatische MBP-Toleranz	58
4.2. Charakterisierung des Phänotyps MBP-spezifischer T Zellen (tg4) nach Transfer in CRP-MBP Mäuse	59
4.2.1. Analyse nach MBP-Immunsierung und adoptivem T Zell-Transfer	59
4.2.2. <i>In vitro</i> Suppressionsassay transferierter Zellen mit Tr1-Phänotyp.....	68
5. Diskussion	70
5.1. Charakterisierung des CRP-MBP x tg4 Mausmodells.....	70

5.2. Charakterisierung MBP-spezifischer T Zellen (tg4) nach Transfer in CRP-MBP Mäuse .	77
5.3. Ausblick	82
6. Zusammenfassung	85
7. Abstract	87
8. Abkürzungsverzeichnis	89
9. Literaturverzeichnis.....	90
10. Kongressbeitrag.....	111
11. Publikationen.....	111
12. Danksagung.....	112
14. Eidesstattliche Erklärung.....	113

1. Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Mechanismen auf T Zellebene zur Auslösung von Autoimmunität in der Leber führen und folglich für die Durchbrechung von hepatisch induzierter Toleranz relevant sind. Aus Vorarbeiten im EAE-Mausmodell ist bekannt, dass die ektopische Expression des Autoantigens Myelin Basisches Protein (MBP) in der Leber zu Toleranz bezüglich dieses Antigens führt. Diese Toleranz wird durch in der Leber generierte Antigen-spezifische regulatorische T Zellen (Treg) vermittelt und schützt die Mäuse vor einem Ausbruch der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (Lüth et al. 2008). Als Mausmodell für unsere Analysen dienten CRP-MBP x tg4 Mäuse, die zusätzlich zum hepatisch exprimierten MBP (CRP-MBP) über einen MBP-spezifischen T Zell-Rezeptor (tg4) verfügen. Anhand dieses Mausmodells galt es zu überprüfen, ob trotz Vorhandensein autoreaktiver MBP-spezifischer T Zellen die hepatische Toleranz entweder persistiert oder durchbrochen wird und ob es zur Induktion von Autoimmunität kommt. Aufgrund der MBP-Expression in Leber und ZNS sollten die Entzündungsparameter in diesen Organen analysiert werden. Darüber hinaus wollten wir anhand des Mausmodells die Relevanz von Treg für die Toleranz näher analysieren und weitere hepatische Toleranzmechanismen untersuchen. Im Speziellen wurden folgende Fragen untersucht:

1) Charakterisierung des CRP-MBP x tg4 Mausmodells:

- Verfügen die Mäuse tatsächlich über MBP-spezifische T Zellen, die das MBP in ZNS und Leber erkennen können?
- Kommt es in diesem Modell zu einer spontanen Entzündungsreaktion gegen das MBP in ZNS und/oder Leber?
- Kommt es in diesem Modell nach MBP-Immunisierung zur Induktion einer MBP-abhängigen Entzündungsreaktion in ZNS und/oder Leber?
- Welche Rolle spielen Treg sowie die Zytokine IL-10 und TGF- β für die Induktion und Aufrechterhaltung hepatischer Toleranz?

2) Charakterisierung MBP-spezifischer T Zellen (tg4) nach Transfer in CRP-MBP Mäuse:

- Differenzieren MBP-spezifische T Zellen in Mäusen mit hepatisch exprimiertem MBP zu pro-inflammatorischen Zellen (Th1, Th17) oder zu regulatorischen Zellen (Treg, Tr1)?
- Welche Auswirkungen hat dies auf die hepatisch induzierte Toleranz gegenüber MBP?

2. Einleitung

2.1. Die Immunologie der Leber: Zwischen Immunität und Toleranz

Die Leber als zentrales Stoffwechselorgan scheint auch in Bezug auf Immuntoleranz und -abwehr eine besondere Rolle zu spielen. Durch ihre anatomische Positionierung zwischen Gastrointestinaltrakt und Systemkreislauf ist sie körperfremden Antigenen aus der Nahrung und mikrobiellen Antigenen ständig ausgesetzt. Diese permanente Exposition scheint einerseits für die Induktion einer entzündlichen Immunantwort prädisponiert zu sein. Da es sich jedoch ebenfalls um nicht-pathogene Antigene handelt, ist die Leber andererseits auch in der Lage Toleranz zu induzieren, um eine Überreaktion des Immunsystems zu verhindern (Tiegs und Lohse 2010). Dass die Leber zur Toleranzinduktion fähig ist, wurde zunächst durch allogene Lebertransplantationen bei Schweinen deutlich. Während verschiedene Organtransplantate allogener Spender abgestoßen wurden, konnte bei Lebertransplantationen Toleranz beobachtet werden (Calne et al. 1969a). Darüber hinaus wurde nach Transplantation der Leber in Kombination mit weiteren Organen die Abstoßung dieser Organe verhindert (Calne et al. 1969b). Auch für die orale Toleranz scheint die Leber mitverantwortlich zu sein. Hierbei werden Antigene, die beispielsweise über die Nahrung wiederholt aufgenommen werden, immunologisch toleriert. Dass die Leber dabei eine wichtige Funktion übernimmt, wurde in vergangenen Studien gezeigt: Konnte das Antigen durch chirurgische Intervention nicht über die Pfortader zur Leber gelangen, wurde keine Toleranz induziert (Cantor und Dumont 1967, Yang et al. 1994). Durch die systemische Toleranzinduktion der Leber kann beispielsweise auch die Immunhomöostase im Zentralen Nervensystem (ZNS) beeinflusst werden. Bei der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), dem Mausmodell der Multiplen Sklerose, wird im ZNS eine autoimmune Entzündung gegen das Myelin Basische Protein (MBP) induziert. In Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression des MBP in der Leber zu Toleranz führt, wohingegen eine MBP-Expression in der Haut keinen Schutz vor EAE generieren kann (Lüth et al. 2008).

2.2. Autoimmune Erkrankungen der Leber

Obwohl die Leber zur Toleranzinduktion fähig ist, findet im Rahmen autoimmuner Lebererkrankungen ein Verlust der lebereigenen Toleranz statt und es wird eine Immunantwort gegen lebereigenes Gewebe gerichtet. Bislang sind drei Lebererkrankungen bekannt, bei denen

autoimmune Prozesse relevant sind: die Autoimmune Hepatitis (AIH), die Primär Biliäre Cholangitis (PBC) und die Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC) (Carbone und Neuberger 2014). Bei allen drei Krankheiten werden Zellen der Leber mutmaßlich durch autoimmune Prozesse zerstört. Allerdings richtet sich die Immunantwort in der AIH gegen Hepatozyten, wohingegen bei PSC und PBC eine pro-inflammatorische Effektorantwort gegen Cholangiozyten generiert wird (Invernizzi 2013). Die genaue Ätiologie aller drei Krankheitsbilder ist bislang unklar; es werden jedoch genetische Einflüsse und Umwelteinflüsse diskutiert (Carbone und Neuberger 2014). Die AIH ist eine entzündliche Autoimmunkrankheit des Leberparenchyms, die akut oder chronisch verlaufen kann (Heneghan et al. 2013). Im Rahmen der AIH finden sich autoreaktive T Zellen, die als entzündliche Infiltrate im Leberparenchym und im Bereich der Portalfelder sichtbar werden (Lohse und Mieli-Vergani 2011). Die PBC zeichnet sich durch chronische Cholestase aus, bei der es in Folge der Entzündung zu immunvermittelter Zerstörung der kleineren intrahepatischen Gallengänge kommt (Kaplan und Gershwin 2005). Dabei finden sich vermehrt autoreaktive CD4+ und CD8+ T Zellen, die gegen Autoantigene gerichtet sind (Gershwin und Mackay 2008). Darüber hinaus scheint in der PBC eine gestörte Homöostase von regulatorischen T Zellen (Treg) und T Helferzellen 17 (Th17) vorzuliegen (Hirschfield und Gershwin 2013). In der PSC führt die chronische Cholestase zu entzündlichen Prozessen, Sklerose und Vernarbung der intra- und extrahepatischen Gallengänge. Histologisch treten dabei lymphozytäre Entzündungsinfiltrate in den Portalfeldern der Leber auf (Aron und Bowlus 2009). Im Gegensatz zur AIH und PBC wird der autoimmune Charakter der PSC jedoch weiterhin kontrovers diskutiert (Hirschfield 2013). Auch wenn sich die drei Krankheiten bezüglich ihrer Pathomechanismen sowie dem klinischen und morphologischen Bild unterscheiden, können zwischen der AIH und der PSC sowie der AIH und der PBC sogenannte „overlap“-Syndrome auftreten, die pathogenetische Gemeinsamkeiten implizieren (Rust und Beuers 2008). Autoimmune Erkrankungen der Leber scheinen für das Verständnis der hepatischen Toleranzmechanismen von besonderem Interesse zu sein: Obwohl die Leber Toleranz induzieren kann, wird die Toleranz gegenüber dem eigenen Gewebe im Rahmen Autoimmuner Lebererkrankungen durchbrochen. Allerdings existieren für keine der drei Krankheiten Mausmodelle, die die zugrundeliegenden Pathomechanismen umfassend abbilden können. Sie sind somit für die Untersuchung der Antigen-spezifischen hepatischen Toleranzinduktion weniger geeignet (Lohse und Mieli-Vergani 2011, Hirschfield und Gershwin 2013, Pollheimer

et al. 2011).

2.3. Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis: Mausmodell der Multiplen Sklerose

Ein Mausmodell, das sich für die Analyse der hepatischen Toleranzinduktion eignet, ist die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE). Die EAE gilt als Modell der Multiplen Sklerose (MS), einer chronisch autoinflammatorischen Erkrankung, bei der es zu entzündlichen Läsionen der Myelinscheiden des ZNS und letztendlich zu neuronalen und axonalen Degenerationen kommt (Compston und Coles 2002). Symptomatisch äußert sich die MS zunächst in neurologischen Dysfunktionen, wie Seh- und Sensibilitätsstörungen sowie Müdigkeit, Gangstörungen und Kontrollverlusten der Blasenfunktion (Noseworthy et al. 2000). Bei einem Teil der Patienten treten diese Symptome schubförmig auf und sind zunächst reversibel. Im weiteren Verlauf geht die Krankheit bei ca. 40% dieser Patienten in einen chronisch-progredienten Verlauf über. Nur bei rund 10% aller Patienten ist die MS von Beginn an chronisch-progredient (Milo und Miller 2014). Bei diesem Verlauf treten oft zunächst muskuläre Dysfunktionen auf, die sich fortschreitend verschlechtern. In späteren Stadien sind auch andere Organsysteme, wie oben genannt, betroffen (Noseworthy et al. 2000). Als ein pathogenetisches Konzept ist beschrieben, dass bei der MS autoreaktive Myelin-spezifische Lymphozyten über die Blut-Hirn-Schranke in das Gewebe des ZNS immigrieren. Diese Zellen sind in der Peripherie voraktiviert und verursachen entzündliche Läsionen der Myelinscheiden des ZNS (Cicarelli et al. 2014). Die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) stellt ein Modell der MS dar und kann in Mäusen durch Immunisierung mit verschiedenen Myelin-Antigenen in einer Emulsion mit Komplettem Freund'schen Adjuvant (CFA) aktiv induziert werden. Die relevanten Myelin-Antigene sind das Proteolipid Protein (PLP), das ein Protein des Myelins ist, das Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) und das Myelin Basische Protein (MBP). Nach Immunisierung der Versuchstiere kommt es innerhalb von 10 bis 15 Tagen zu aufsteigenden Lähmungserscheinungen, beginnend am Schwanz bis zu den Vorderläufen (Robinson et al. 2014). Mit Hilfe der Mausmodelle konnten in der Vergangenheit die pathogenetischen autoimmunen Vorgänge in der EAE auf zellulärer Ebene untersucht werden. Ursprünglich wurden vor allem Interferon- γ -(IFN- γ)- und Interleukin-2-(IL-2)-sekretierende T Helferzellen 1 (Th1) als verantwortliche inflammatorische Zellpopulation angesehen, die im Rahmen der EAE in das ZNS infiltrieren (Sriram et al. 1982). So waren beispielsweise Mäuse mit fehlender T-bet Expression, einem Transkriptionsfaktor, der für die

Th1 Zell-Effektorfunktion essenziell ist, resistent gegenüber einer EAE-Induktion (Bettelli et al. 2004). Die Beobachtung, dass IFN- γ knock-out Mäuse normale EAE-Verläufe zeigten, hinterfragt allerdings dieses Paradigma (Willenborg et al. 1999). Mittlerweile ist evident, dass ein weiterer Subtyp, die IL-17-produzierenden Th17 Zellen, an der EAE-Induktion beteiligt ist (Becher et al. 2003). Th17 Zellen, deren Expansion durch IL-23 getriggert wird, vermitteln ihre pathogene Wirkung vor allem über IL-17, IL-6 und Tumornekrosefaktor (TNF) (Langrish 2005). In IL-23-defizienten Mäusen konnte keine EAE induziert werden, was für eine entscheidende Beteiligung von Th17 Zellen an der Entwicklung der EAE spricht (Cua et al. 2003). Darüber hinaus zeigten Mäuse, die mit anti-IL17 Antikörper behandelt wurden, eine verringerte Inzidenz und einen abgeschwächten Verlauf der Krankheit (Rohn et al. 2006).

Wichtige regulatorische Funktionen in der EAE werden den Treg Zellen zugeschrieben. CD4+CD25+ Treg aus naiven Spendertieren konnten *in vitro* die Proliferation und IFN- γ -Produktion von vorher durch Immunisierung generierten Th1 Zellen im MOG-spezifischen EAE Modell inhibieren. Durch adoptiven Transfer dieser Treg wurde der EAE-Verlauf abgeschwächt (Kohm et al. 2002). Eine Reduzierung des Treg-Anteils *in vivo* kann durch die Treg-Depletion mittels anti-CD25 Antikörper erreicht werden, da CD25 einen Oberflächenmarker von Treg darstellt. Bei Mäusen, in denen nach einer solchen Behandlung eine EAE induziert wurde, war die typisch eintretende Regenerierung im Vergleich zur Kontrollgruppe verzögert (McGeachy et al. 2005). *In vitro* induzierte CD25+Foxp3+ Treg konnten in Mäusen eine EAE-Induktion supprimieren. Diese Treg differenzierten aus CD4+CD25-Foxp3- T Zellen, die für das Myelin Proteolipid Protein (PLP)₁₇₈₋₁₉₁ spezifisch waren, unter dem Einfluss von TGF- β , Retinolsäure und IL-2. *In vivo* war unter Antigen-Stimulation eine Proliferation der Treg zu beobachten (Zhang et al. 2010). Lüth et al. zeigten, dass durch ektope Expression von MBP durch Hepatozyten eine MBP-spezifische CD4+CD25+Foxp3+ Treg-Population induziert werden konnte und die Mäuse vor EAE geschützt waren. Die MBP-spezifischen Treg waren keine im Thymus gereiften natürlichen Treg (nTreg), sondern differenzierten aus konventionellen CD4+CD25- T Zellen. Die MBP-spezifischen CD4+CD25+Foxp3+ Treg konnten nach MBP-Stimulation *in vitro* die Proliferation von konventionellen CD4+CD25- T Zellen hemmen (Lüth et al. 2008). All dies verdeutlicht, dass Treg in der EAE wichtige regulatorische Funktion übernehmen. Der genaue Suppressionsmechanismus bleibt aber weiter unklar. Darüber hinaus scheinen auch IL-10-produzierende Typ 1 regulatorische Zellen (Tr1 Zellen) für die EAE-Regulation relevant zu

sein. Meiron et al. konnten zeigen, dass Th1 Zellen unter dem Einfluss des Chemokins CXCL12 (auch: stromal cell-derived factor 1) vermehrt zu CD4+CD25-Foxp3-IL-10^{high} Antigen-spezifischen Tr1 Zellen wurden. Diese Zellen waren in der Lage eine bereits bestehende EAE zu supprimieren (Meiron et al. 2008). Auch wenn bislang nicht alle Pathomechanismen in der EAE geklärt sind, eignet sich das EAE-Mausmodell zur Analyse der T Zellmechanismen im Rahmen der hepatischen Toleranzinduktion.

2.4. Antigen-präsentierende Zellen in der Leber

Die verschiedenen leberresidenten nicht-parenchymatösen Zellen sind bezüglich der hepatischen Toleranz offenbar von zentraler Bedeutung. Grundsätzlich wird die Immunantwort von B und T Zellen über die Interaktion mit Antigen-präsentierenden Zellen moduliert. Dendritische Zellen (DC) sind solch professionelle Zellen, die in der Peripherie Antigene aufnehmen, prozessieren und in lymphatischen Organen den B und T Zellen präsentieren (Banchereau und Steinman 1998). In der Leber sind jedoch neben DC und Kupfferzellen, den leber-spezifischen Makrophagen, beispielsweise auch leberspezifische sinusoidale Endothelialzellen (LSEC) in der Lage Antigene zu präsentieren. Die Antigene werden auf Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Klasse I und II Molekülen den T Zellen präsentiert, die über den Blutkreislauf kontinuierlich die Leber passieren (Böttcher 2011). Die T Zellen erkennen spezifisch das präsentierte Antigen über den T Zell-Rezeptor und werden so aktiviert (Bogdanos et al. 2013). Diese Aktivierung führt in der Leber vermehrt zu anti-inflammatorischen Immunantworten und somit zu Toleranz (Carambia et al. 2013). Dazu trägt auch das tendenziell tolerogene Zytokinmilieu in der Leber bei, das beispielsweise von LSEC und KC induziert wird (Knolle et al. 1999, Limmer et al. 1998). Die in der Leber induzierten regulatorischen Zellen sind offenbar wiederum in der Lage weitere Zellen, auch in der Peripherie, regulatorisch zu beeinflussen und somit auf das gesamte Immunsystem Einfluss zu nehmen (Carambia et al. 2014, Li und Tian 2013).

Die dendritischen Zellen in der Leber lassen sich in zwei Subtypen unterteilen: myeloide und plasmacytoide DC (Crispe 2009). Die unreifen myeloiden DC können nach Antigen-Aufnahme entweder Toleranz- oder Immunität-induzierend wirken (Lutz und Schuler 2002). Sie exprimieren das Molekül PD-L1 (programmed-death ligand 1), das die Aktivierung von regulatorischen T Zellen induziert (Liu et al. 2013). Plasmacytoide DC hingegen spielen eine Rolle in der anti-viralen Immunantwort (Kingham et al. 2007). Sowohl mDC als auch pDC

präsentieren Antigene über MHC Klasse II Moleküle und exprimieren kostimulatorische Moleküle, allerdings auf niedrigerem Niveau in Hinblick auf nicht-hepatische DC (Thomson und Knolle 2010). Im Vergleich zu nicht-hepatischen DC fördern leberresidente DC vermehrt die Induktion suppressiver T regulatorischer Zellen (Bamboot et al. 2009).

Kupfferzellen, die als Makrophagen in der Leber fungieren, exprimieren MHC Klasse II Moleküle und PD-L1, das die T Zell Proliferation hemmt, und produzieren anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 und TGF- β , sowie Prostaglandine (Crispe 2014, Thomson und Knolle 2010, Perez et al. 1997). Des Weiteren können sie offenbar auf Treg wirken und deren IL-10 Produktion positiv beeinflussen (Breous et al. 2009).

Auch LSEC scheinen die Induktion von Toleranz zu begünstigen (Knolle et al. 1999). Sie verfügen über MHC Klasse I und II Moleküle sowie über die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86, die für die T Zell-Aktivierung relevant sind (Knolle und Limmer 2001, Böttcher 2011). Bei Aktivierung des Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) produzieren sie das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 (Knolle et al. 1998). Naive CD4⁺ T Zellen differenzieren unter dem Einfluss von LSEC vermehrt zu anti-inflammatorischen T Zellen (Kruse et al. 2009). Darüber hinaus zeichnen sich die LSEC-aktivierten CD4⁺ T Zellen durch eine Produktion von IL-4 und IL-10 aus (Knolle et al. 1999). In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass LSEC unter dem Einfluss von TGF- β effektive Induktoren von Treg sind (Carambia et al. 2014).

Hepatozyten können unter pro-inflammatorischen Bedingungen über MHC Klasse II Moleküle Antigene präsentieren und CD4⁺ T Zellen aktivieren. Im experimentellen Kontext führte diese Aktivierung durch Hepatozyten nicht zu pro-inflammatorischen Vorgängen (Herkel et al. 2003). Eine CD8⁺ Aktivierung findet über Antigen-Präsentation mittels MHC Klasse I Moleküle statt. Dies führt *in vitro* jedoch zum Zelluntergang der CD8⁺ T Zellen und ist somit immunsuppressiv (Bertolino et al. 1998).

2.5. CD4⁺ T Zell Differenzierung

Die verschiedenen Subtypen der T Helferzellen, die im Rahmen autoimmuner Erkrankungen pro- oder anti-inflammatorische Wirkungen vermitteln, differenzieren aus naiven CD4⁺ T Zellen. Eine Aktivierung naiver T Zellen resultiert aus der Stimulierung des T Zell-Rezeptors und Kostimulation von Oberflächenmolekülen wie CD28 durch CD80 und CD86, die wiederum von Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert werden (Park et al. 2005). Als

weiteres kostimulatorisches Signal gilt ICOS (Inducible T-cell Costimulator oder CD278), das zur CD28-Superfamilie zählt (Dong und Nurieva 2003). Ursprünglich wurden anhand des spezifischen Zytokinprofils zunächst nur zwei Subtypen unterschieden: Th1 und Th2 Zellen (Mosmann et al. 1986). In Anwesenheit von IL-12, das von Antigen-präsentierenden Zellen produziert wird, differenzieren CD4⁺ T Zellen zu Th1 Zellen (Seder et al. 1993, Robinson et al. 1997). Sie zeichnen sich durch ihre Zytokinproduktion von IFN- γ , IL-2 und TNF- α (Tumor Nekrose Faktor α) aus und induzieren eine Zell-vermittelte Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene (Jin et al. 2008, Swain et al. 1990). Th2 Zellen differenzieren unter IL-4 Einfluss und produzieren IL-4, IL-5 und IL-13 (Swain et al. 1990, Robinson et al. 2014). Sie fördern die humorale Immunantwort und Abwehr gegen extrazelluläre Parasiten (Robinson et al. 2014). Die Differenzierung der T Helferzellen wird durch verschiedene Transkriptionsfaktoren reguliert. So bewirkt die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT4 und T-bet eine Th1 Differenzierung, wohingegen GATA-3 und STAT6 die Th2 Differenzierung regulieren (Szabo et al. 2003, Glimcher und Murphy 2000, Zhen und Flavell 1997).

Als weiterer T Zell-Subtyp gelten Th17 Zellen, die das Zytokin IL-17, jedoch kein IFN- γ und IL-4 produzieren (Park et al. 2005). Darüber hinaus werden sie über die Expression des Transkriptionsfaktors ROR γ t charakterisiert (Ivanov et al. 2006). Für die Differenzierung von murinen Th17 Zellen aus naiven T Zellen scheinen IL-6 und TGF- β essenziell zu sein (Bettelli et al. 2006). IL-21 spielt offenbar für die Expansion, IL-23 wiederum für die Stabilisierung eine entscheidende Rolle (Zhou et al. 2007, Aggarwal et al. 2003). IL-17 vermittelt seinen pro-inflammatorischen Effekt über den IL-17-Rezeptor, der auf vielen Lymphozyten und Zellen anderer Gewebe exprimiert wird (Gaffen 2009). Über die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase) führt IL-17 letztendlich zur Produktion verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF α (Schwandner et al. 2000, de Jong et al. 2009).

Regulatorische T Zellen können die pro-inflammatorische Effektorantwort auf fremde und körpereigene Antigene beeinflussen und sind somit für die Toleranzinduktion und -aufrechterhaltung essenziell (Jonuleit und Schmitt 2003, Roncarolo und Battaglia 2007). Dabei entsteht ein Teil der regulatorischen Zellen, die CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T Zellen (nTreg) im Thymus (Roncarolo und Battaglia 2007). Der andere Teil wird in der Peripherie im Rahmen einer Immunantwort induziert. Dazu zählen Th3 und Tr1 Zellen sowie Foxp3⁺ induzierte Treg (iTreg) (Roncarolo und Battaglia 2007). Die genannten Subtypen können auch hinsichtlich

ihres individuellen Suppressionsmechanismus unterschieden werden: Treg wirken vor allem über Zellkontakt mit membrangebundenen Molekülen. Tr1 und Th3 Zellen vermitteln ihre immunsuppressive Funktion hauptsächlich über Zytokine wie IL-10 und TGF- β (Jonuleit und Schmitt 2003).

Diese verschiedenen T Zell-Differenzierungsprogramme scheinen eine gewisse Plastizität aufzuweisen. So konnte gezeigt werden, dass Th1 und Th17 Zellen sowohl T-bet als auch ROR γ t exprimieren können und sich Th17 Zellen unter Einfluss von IL-12 zu Th1 Zellen umwandeln konnten (Annunziato et al. 2007). Obwohl Treg und Th17 Zellen eigentlich antagonistisch wirken, existiert offenbar eine Subpopulation, die sowohl Foxp3 als auch ROR γ t exprimiert und in beide Subtypen differenzieren kann. Bei dieser Differenzierung scheint TGF- β eine Schlüsselrolle zu spielen (Zhou et al. 2008).

2.5.1. Regulatorische T Zellen

Treg Zellen wurden zunächst als Zellen mit regulativer Funktion beschrieben, die über Expression der Oberflächenproteine CD4⁺ und CD25⁺ (IL-2Ra chain) verfügen und in der Lage sind, in Mäusen Autoimmunität zu unterdrücken (Sakaguchi et al. 1995). Mit der Identifikation des Transkriptionsfaktors Foxp3 wurde ein weiterer Marker für CD4⁺CD25⁺ Treg gefunden, der spezifisch für murine Treg ist (Fontenot 2003, Hori et al. 2003, Wan and Flavell 2005). In humanen und murinen Studien konnte gezeigt werden, dass ein Foxp3-Defizit in einen Verlust der suppressiven Kapazität mündet und darüber hinaus zur Induktion von autoimmunen Erkrankungen führt (Bennet et al. 2001, Brunkow et al. 2001). Foxp3⁺ Treg wiederum können aufgrund ihrer Genese in zwei Subtypen unterteilt werden: Sogenannte natürliche Foxp3⁺ Treg (nTreg) werden im Thymus durch Interaktion des T Zell-Rezeptors mit MHC Klasse II Molekülen generiert (Bensinger et al. 2001). Dabei entwickeln sich CD4⁺Foxp3⁺ Treg aus einer CD4⁺CD25⁺ Subpopulation (Girdhari und Bromberg 2009).

Induzierte Foxp3⁺ Treg (iTreg) können in der Peripherie im Rahmen einer Immunantwort aus konventionellen Foxp3⁻ T Zellen generiert werden (Walker et al. 2003, Curotto de Lafaille und Lafaille 2009, Liang et al. 2005). Als entscheidendes Signal gilt dabei TGF- β , das auch bei der *in vitro* Generierung von Foxp3⁺ Treg aus peripher isolierten CD4⁺CD25⁻ T Zellen wirksam ist (Fu et al. 2004). Die Expression von Foxp3, die beide Subtypen kennzeichnet, wird epigenetisch reguliert. Vollständige Demethylierung am CpG-Motiv im Foxp3-Promoter führt dabei zu einer verstärkten Transkription und letztendlich stärkeren suppressiven Kapazität

(Floess et al. 2007). Dabei weisen nur die im Thymus generierten nTreg vollständige Demethylierung auf und verfügen damit über eine stabilere Foxp3-Expression, sowohl hinsichtlich muriner (Kim und Leonard. 2007) als auch humaner Treg (Baron et al. 2007). Im Gegensatz dazu ist der Demethylierungsstatus der TGF- β induzierten iTreg variabel, was zu einer Instabilität von iTreg führt (Lal et al. 2008, Floess 2007). Als weiterer Identifikationsmarker wird Helios diskutiert, ein Transkriptionsfaktor der Ikaros-Familie, der offenbar selektiv auf im Thymus induzierten Foxp3⁺ Treg Zellen exprimiert wird (Thornton et al. 2010). Treg Zellen werden über ihren T Zell-Rezeptor aktiviert und vermitteln ihre immunsuppressive Wirkung über Zellkontakt oder Zytokine (Thornton und Shevach 1998). So können sie die Funktion von APC modulieren oder über Granzym B und Perforin eine Suppression pro-inflammatorischer Zellen bewirken (Tang et al. 2005, Gondek et al. 2005, Grossman et al. 2004). Für die suppressive Kapazität von Treg scheint das koinhibitorische Molekül CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4) von Bedeutung zu sein. Es wird konstitutiv auf der Zelloberfläche aktivierter Treg exprimiert und konkurriert um die Bindung an CD80 und CD86 mit CD28, das wiederum auf T Helferzellen exprimiert wird (Takahashi et al. 2000, van der Merwe et al. 1997, Walunas et al. 1994). In Mäusen, die eine Treg-spezifische CTLA-4 Defizienz aufwiesen, konnten spontane schwere Verläufe von autoimmunen Krankheiten beobachtet werden (Wing et al. 2008). Treg wirken aber auch über anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 und TGF- β , entweder durch eigene Produktion oder mittelbar durch Induktion in anderen Zellen (Asseman et al. 1999, Suri-Payer und Cantor 2001, Fahlen et al. 2005, Nakamura et al. 2004). Dabei kann TGF- β von Treg in membrangebundener oder löslicher Form produziert werden (Schmidt et al. 2012).

Für die Lebertoleranz sind Treg offenbar von großer Bedeutung. Im ConA-Hepatitis-Modell in der Maus konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Treg durch IL-10-Produktion Toleranz induzieren (Erhardt et al. 2007). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine antigenspezifische Generierung von Treg durch die ektopische Expression eines Autoantigens in der Leber induzierbar ist. Auf diese Weise wurde Toleranz hinsichtlich dieses spezifischen Antigens generiert (Lüth et al. 2008).

2.5.2. Typ 1 regulatorische T Zellen

Einen weiteren Subtyp innerhalb der T regulatorischen Zellen stellen die Interleukin-10-produzierenden Typ 1 regulatorischen Zellen (Tr1 Zellen) dar. Sie werden zunächst über die

spezifische Zytokinproduktion definiert und können so von Th1 und Th2 Zellen abgegrenzt werden: Infolge T Zell-Rezeptor vermittelter Antigen-spezifischer Aktivierung weisen sie hohe Produktionsraten von IL-10, jedoch niedrige Produktionsraten von IL-2, IL-4 und IL-17 auf (Bacchetta et al. 1990, Bacchetta et al. 1994, Groux et al. 1997). Darüber hinaus ist eine Produktion von TGF- β und IFN- γ bekannt (Bacchetta et al. 1990, Groux et al. 1997). Kürzlich wurde entdeckt, dass die Kombination der Oberflächenmarker CD49b und LAG-3 (Lymphozyten-aktivierendes Gen 3) ein stabiler Detektionsmarker für humane und murine Tr1 Zellen ist (Gagliani et al. 2013). Auch wenn die suppressive Wirkung der Tr1 Zellen hauptsächlich über IL-10 und TGF- β vermittelt wird, werden weitere Suppressionsmechanismen wie Zytolyse und Hochregulierung von inhibitorischen Rezeptoren wie CTLA-4, PD-1 und ICOS diskutiert (Akdis 2008, Bacchetta et al. 2004, Groux et al. 1997, Haringer et al. 2009, Magnani et al. 2011). Die Eliminierung myeloider Antigen-präsentierender Zellen erfolgt dabei offenbar mittels Granzym B (Magnani et al. 2011). Tr1 Zellen werden über den T Zell-Rezeptor aktiviert und entstehen aus naiven T Zellen (Groux et al. 1997, Vieira et al. 2004). Darüber hinaus wird jedoch diskutiert, ob für eine effektive Induktion von Tr1 Zellen weitere Faktoren, wie IL-10 und IFN- α essenziell sind (Groux et al. 1997, Levings et al. 2001, Vieira et al. 2004). Der Transkriptionsfaktor Foxp3 ist, anders als bei Treg, kein obligates Charakteristikum von Tr1 Zellen. Jedoch kann er unter Aktivierung hochreguliert werden (Vieira et al. 2004, Levings et al. 2005). Viera et al. konnten zeigen, dass die Suppressionskapazität mit der Effektivität von *ex vivo* generierten CD4+CD25+ Treg vergleichbar ist (Vieira et al. 2004). Die regulative Kapazität von Tr1 Zellen in autoimmunen Entzündungen wurde zunächst in Zusammenhang mit Colitis gezeigt. Im Modell der SCID Maus (severe combined immunodeficiency), bei der mittels CD4+CD45RB^{high} T Zellen eine Colitis induziert werden kann, wurde beobachtet, dass die Antigen-spezifische *in vivo* Aktivierung von transferierten Tr1 Zellen zu Immunsuppression führte (Groux et al. 1997). Auch in der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), dem Mausmodell der Multiplen Sklerose, sind Tr1 Zellen offenbar wichtige Regulatoren der Immunantwort. Eine aktive Induktion von Tr1 Zellen *in vivo* mittels löslichem Myelin Basischen Protein (MBP) konnte bei Ratten, die mit MBP immunisiert waren, eine Besserung der EAE erwirken (Wildbaum et al. 2002). Barrat et al. konnten zeigen, dass IL-10-produzierende Tr1 Zellen, die *in vitro* durch immunsuppressive Stimuli, wie Vitamin D3 und Dexamethason, aus naiven CD4+ T Zellen generiert wurden, vor einer EAE schützen konnten (Barrat et al. 2002).

2.6. Anti-inflammatorische Zytokine in der Leber: TGF- β und IL-10

Eine wichtige Rolle in der Regulierung von Toleranz und Immunhomöostase nehmen regulatorische und pro-inflammatorische Zytokine ein, die die Differenzierung und Effektorwirkung der Lymphozyten beeinflussen (Sanjabi et al. 2009). Die regulatorischen Zytokine TGF- β und IL-10 scheinen dabei im Kontext der hepatischen Toleranz und Autoimmunität von besonderer Bedeutung zu sein. Sie werden in der Leber nicht nur von Treg und Tr1 Zellen, sondern auch durch die leber-residenten nicht-parenchymatösen Zellen, wie Kupffer Zellen und LSEC produziert (Crispe 2011, DelPrete 1993, Thomson und Knolle 2014, Groux et al. 1997, Li und Flavell 2008, Nakamura et al. 2004, Wan et al. 1997).

Das Zytokin Transforming growth factor β (TGF- β) wirkt mittelbar über Signalkaskaden und mündet in der Regulierung von Transkription (Shi et al. 2003). Es liegt zunächst in einer Pro-Form vor und kann intrazellulär durch Furin zu latentem TGF- β prozessiert werden (Annes et al. 2003). Die latente Form besteht aus LAP (latency-associated peptide), dem N-terminalen Ende des pro-TGF- β , und dem reifen TGF- β , welches mit LAP verbunden ist. Die latente Form bindet an das transmembran exprimierte GARP (Receptor glycoprotein-A repetitions predominant), das offenbar spezifisch auf aktivierten Treg exprimiert wird (Tran et al. 2009, Stockis et al. 2009). Es wird vermutet, dass das latente TGF- β durch proteolytische Spaltung aktiviert und so die Freisetzung der aktiven Form induziert wird (Wipff und Hinz 2008). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der LAP/TGF- β -Komplex die Suppression von aktivierten T Zellen induzieren kann und an der *de novo*-Synthese von CD4Foxp3⁺ Treg beteiligt ist (Andersson et al. 2008). Auch für die periphere Toleranzinduktion ist TGF- β von zentraler Bedeutung. So können naive T Zellen unter dem Einfluss von TGF- β den Transkriptionsfaktor Foxp3 exprimieren und zu regulatorischen T Zellen differenzieren (Wan und Flavell 2005). Ferner wird diskutiert, inwiefern TGF- β die Entstehung von regulatorischen T Zellen im Thymus positiv beeinflussen kann. Bislang bleibt allerdings unklar, auf welchen Zeitraum der Thymusentwicklung dies zutrifft (Li und Flavell 2008). Bei fehlendem oder defizitärem TGF- β -Signalweg, beispielsweise in Mäusen mit dominant-negativem TGF- β -Rezeptor, kommt es zu vermehrter T Zell-Aktivierung und Differenzierung von T Effektorzellen und somit zur Fehlregulierung der Immunhomöostase (Gorelik und Flavell 2000, Li et al. 2006). Darüber hinaus scheint TGF- β einen inhibitorischen Effekt auf die Aktivierung des T Zell-Rezeptors zu haben (Chen et al. 2003). Im Zusammenwirken mit IL-6 kann TGF- β

jedoch die Generierung von Th17 Zellen induzieren und auf diese Weise pro-inflammatorisch wirken (Veldhoen et al. 2006). Im Colitis-Modell konnten in T Zell-spezifisch TGF- β -defizienten Mäusen gesteigerte Th1 und Th2 Zell-Antworten und eine Induktion von Colitis beobachtet werden. Diese Mäuse waren aber tolerant in Bezug auf EAE-Induktion, was auf eine verminderte Th17 Induktion hindeutet (Li et al. 2007). In Mäusen, die TGF- β selektiv in der Leber exprimierten, war die hepatische Expression nicht ausreichend, um TGF- β knock-out Mäuse vor Autoimmunität zu schützen. Daher scheint die autokrine Aktivierung eine weitere wichtige Rolle zu spielen (Longenecker et al. 2002). Lüth et al. konnten im EAE-Mausmodell zeigen, dass die Antigen-spezifische Konversion von konventionellen T Zellen zu Treg TGF- β -abhängig ist (Lüth et al. 2008).

Das Zytokin IL-10 wirkt auf verschiedenste Zelltypen, die den IL-10-Rezeptor exprimieren, über Jak1 und Tyk2 Kinasen und den Stat3 Transkriptionsfaktor und verfügt über stark immunsuppressive Kapazität (Moore et al. 2001, O`Shea und Murray 2008). So supprimiert es beispielsweise die Antigen-Präsentation durch DC und Makrophagen, indem es die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, sowie die Expression von MHC Klasse II und der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 negativ beeinflusst (Moore et al. 2001). Dieser Effekt wurde auch bezüglich LSEC beschrieben (Carambia et al. 2013). Darüber hinaus regelt es dort die Aktivität des Mannose-Rezeptors herunter, der für die Antigen-Aufnahme zuständig ist (Knolle et al. 1998). Th1 Zellen, die eigentlich pro-inflammatorisch wirken, können IL-10 produzieren, vermutlich um überschießende Immunreaktion durch andere Th1 Zellen im inflammatorischen Kontext zu inhibieren (Jankovic et al. 2007). Das anti-inflammatorische Potenzial von IL-10 wurde auch in IL-10 knock-out Mäusen in Bezug auf die Immunhomöostase im Darm deutlich. Die IL-10 knock-out Mäuse zeigten spontane inflammatorische Vorgänge im Darm und vermehrte Differenzierung von IFN- γ -produzierenden T Zellen (Kuhn et al. 1993). Im Colitis-Modell wurde durch das Blocken von IL-10 der protektive Effekt von Treg in der T Zell-Transfer-induzierten Colitis aufgehoben (Asseman et al. 1999). Auch bezüglich Hepatitis konnte die wichtige regulatorische Funktion von IL-10 gezeigt werden: Im ConA-Hepatitis-Modell hatte die exogene Gabe von IL-10 einen protektiven Effekt, wohingegen IL-10 knock-out Mäuse schwerere Pathologien aufwiesen (Di Marco et al. 1999). Darüber hinaus konnte IL-10 im ConA-Hepatitis-Modell Toleranz induzieren. Dies wurde evident, da in IL-10 knock-out Mäusen keine Toleranz beobachtet wurde und die Toleranz nach Behandlung mit Antikörpern gegen den IL-10-Rezeptor reversibel

war (Erhardt et al. 2007)

Durch verschiedene Transferversuche wurde deutlich, dass die periphere Induktion IL-10-produzierender Foxp3⁺ Treg von TGF- β abhängig ist (Maynard et al. 2007). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass IL-27 die IL-10 Produktion von T Zellen reguliert und TGF- β diese Produktion weiter stimuliert (Awashti et al. 2007). Die immunsuppressiven Mechanismen von TGF- β und IL-10 scheinen somit Schnittstellen aufzuweisen, sodass für die Immuntoleranz auch das Zusammenspiel von IL-10 und TGF- β von Bedeutung ist.

2.7. Hepatische Toleranzinduktion im EAE-Mausmodell

Mithilfe des EAE-Mausmodells wurde bereits evident, dass die ektopische Expression des Myelin Basischen Proteins in der Leber zu Toleranz bezüglich des Antigens führt und die Mäuse vor einem Ausbruch der EAE geschützt sind (Lüth et al. 2008). Aus diesem Grund scheint das EAE-Mausmodell geeignet, um die hepatischen Toleranzmechanismen auf T Zellebene weiter zu analysieren, indem die Immunantworten auf das MBP in ZNS und Leber untersucht werden. Für die vorliegende Arbeit wurden transgene Mäuse der Linie CRP-MBP verwendet, die MBP ektopisch in der Leber exprimieren. MBP wird in diesen Mäusen konstitutiv transgen unter Kontrolle des humanen C-reaktiven Protein (CRP) Promoters exprimiert, der spezifisch für Hepatozyten ist (Weinhold und Ruther 1997). Um zu gewährleisten, dass die Mäuse für eine EAE-Induktion suszeptibel sind, wurden sie mit B10.PL Mäusen gekreuzt (CRP-MBP x B10.PL). B10.PL Mäuse weisen einen H-2^u MHC Haplotyp auf und exprimieren im ZNS das immundominante Epitop des Myelin Basischen Proteins, das aminoterminal acetylierte Peptid Ac1-9. Sie sind somit suszeptibel für eine Th1-vermittelte EAE-Induktion (Fairchild 1993). Um die Affinität des Ac1-9 Peptid zum MHC Klasse II Molekül zu erhöhen, wurde Lysin an Position 4 durch Tyrosin ersetzt. Auf diese Weise konnte eine effizientere Lymphozytenaktivierung erreicht werden (Lüth et al. 2008). Um zu gewährleisten, dass die Mäuse prinzipiell zu einer Immunantwort gegenüber MBP fähig sind, wurden die Mäuse der Linie CRP-MBP mit der Linie tg4 verpaart, die wiederum einem B10.PL-Hintergrund entstammen (CRP-MBP x tg4). Mäuse der Linie tg4 exprimieren obligat einen transgenen T Zell Rezeptor (TCR) für MBP Ac1-9 und sind daher für eine EAE-Induktion suszeptibel (Liu et al. 1995).

3. Material und Methoden

3.1 Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Analytische Waage „Scout Pro“	Ohaus, Nänikon, Schweiz
Autoklav „VX-120“	Systec GmbH, Wettenberg
CO ₂ Inkubator	SANYO Biomedica, München
Digitalkamera Moticam 2500	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Durchflusszytometer „LSR II“	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometer „FACSAria™ Illu“	BD Biosciences, Heidelberg
ELISA-Auslesegerät „Opsys MRX TC II“	Dynex Technologies, Denkendorf
Lichtmikroskop „Axiovert 40 CFL“	Carl Zeiss Microimaging, Jena
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
Schüttelwasserbad „GFL 1083“	GFL - Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Sicherheitswerkbank „Lamin Air“	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Trennmagnet „QuadroMACS™“	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Tisch-pH/Ionen Messgerät „Seven Compact™S220“	Carl Roth, Karlsruhe
Tischzentrifuge „Biofuge pico“	Heraeus Instruments, Osterode

Vortex „Reax 2000“	Heidolph Instruments, Schwabach
Zentrifuge „5417R“	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge „Megafuge 2.0“	Heraeus Instruments, Osterode

3.2. Materialien

Produktbezeichnung	Hersteller
4YMBP (Acetyl-ASQYRPSQR-COOH), Myelin Basisches Protein-Peptid	Panatecs, Heilbronn
70% Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Adjuvant Complete Freund (CFA)	Difco Laboratories, Detroit; USA
Anti-APC MicroBeads	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach
Anti-FITC MicroBeads	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach
Anti m CD25 (Klon: PC-61.5.3)	BioXCell, West Lebanon; USA
Aqua ad iniectabilia	Baxter, Unterschleißheim
BD Golgi Plug	BD Pharmingen, Heidelberg
Biotin Rat anti-Mouse CD4	BD Pharmingen, Heidelberg
Bovines Serumalbumin (BSA) „Fraction V“	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Calciumchlorid (CaCl ₂) x 2H ₂ O	Merck, Darmstadt
CellTrace™ CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester)	Invitrogen, Darmstadt
CellTrace™ Violet stain	Invitrogen, Darmstadt
CD11c MicroBeads	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach
Click's Medium (EHAA)	Irvine Scientific, Santa Ana; USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Eindeckmedium Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin	Roth, Karlsruhe
Kompensationspartikel „CompBeads“	BD Pharmingen, Heidelberg
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe

Fc-Block, Anti-Mouse CD16/CD32	eBioscience, Frankfurt
Fetales Kälberserum	Invitrogen, Karlsruhe
Hämatoxylin	Roth, Karlsruhe
IMDM	Invitrogen, Darmstadt
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
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 Bioscience, Heidelberg
Ketamin	aniMedica GmbH, Senden
LS-Columns	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach
M. Tuberculosis H37 RA	Difco Laboratories, Detroit; USA
MACS® Pre-Separation Filters	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach
Maxisorp Microtiterplatten	Nunc, Schwerte
Metallsieb 100µm	VWR International GmbH, Darmstadt
Nylonsieb Cell Strainer 100µm, 40µm	BD Biosciences, Heidelberg
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe
Optiprep	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
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, München
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Purified NA/LE Hamster Anti-Mouse CD28	Biolegend, San Diego; USA
Purified NA/LE Hamster Anti-Mouse	Biolegend, San Diego; USA

CD3e	
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Rompun 2%	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Röhren, Flow Cytometry	Sarstedt, Nümbrecht
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄) 2N Lösung	Carl Roth, Karlsruhe
Serologische Pipetten	Greiner bio-one, Frickenhausen
Spritzen, BD Plastipak	BD Biosciences, Heidelberg
Stabpipetten	Greiner bio-one, Frickenhausen
Sterilfilter „Filtropur V50“	Sarstedt, Nümbrecht
Superfrost-Objektträger	Menzel GmbH, Braunschweig
TMB Plus ready-to-use Substrate	Kementec Diagnostics, Köln
Trypanblau (0,4%)	Invitrogen, Darmstadt
Tween® 20	Merck, Darmstadt
Verschlussfilm „Rotilabo®“	Carl Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid 30% (H ₂ O ₂)	Merck, Millipore, Darmstadt
Xylol	O. Kindler GmbH, Freiburg
Zellkulturplatten Flachboden, Rundboden; 96-well Format	Sarstedt, Nümbrecht

3.3. Kits

Kits	Hersteller
Foxp3 Staining Buffer Set	eBioscience, Frankfurt
mouse IFN- γ DuoSet ELISA Development Kit	R&D Systems, Wiesbaden
mouse IL-17 DuoSet ELISA Development Kit	R&D Systems, Wiesbaden
mouse IL-10 DuoSet ELISA Development	R&D Systems, Wiesbaden

Kit	
mouse GM-CSF DuoSet ELISA Development Kit	R&D Systems, Wiesbaden

3.4. Antikörper (AK) für die Durchflusszytometrie

FACS-Antikörper	Klon	Hersteller
CD3 FITC	17A2	BioLegend
CD3ε PE	145-2C11	BioLegend
CD4 Alexa Fluor 700	RM4-5	BD Biosciences
CD4 Brilliant Violet 421	GK1.5	BioLegend
CD4 PE/Dazzle 594	RM4-5	BioLegend
CD8 APC	53-6.7	BioLegend
CD25 PE	PC61	BioLegend
CD25 FITC	7D4	BD Bioscience
CD44 FITC	IM7	BD Bioscience
CD44 PE	IM7	BD Bioscience
CD45.1 FITC	A20	BioLegend
CD45.1 APC	A20	BioLegend
CD45.1 Alexa Fluor 700	A20	BioLegend
CD45.1 Pacific Blue	A20	BioLegend
CD45.2 APC	104	BioLegend
CD45.2 PE	104	BioLegend
CD45.2 Brilliant Violet 421	104	BioLegend
CD49b PE	HMa2	BioLegend
CD62L Alexa Fluor 700	MEL-14	BD Bioscience
CD69 Brilliant Violet 421	H1.2F3	BioLegend
CD210 (IL-10 R) PE	1B1.3a	BioLegend
CD223 (LAG-3) APC	C9B7W	BioLegend
Foxp3 APC	FJK-16s	eBiosciences

Foxp3 FITC	FJK-16s	eBiosciences
IFN- γ Alexa Fluor 700	XMG1.2	BD Bioscience
IL-10 Brilliant Violet 421	JES5-16E3	BioLegend
IL-17 PE	-	BD Bioscience
PD-1 (CD279) Brilliant Violet 421	29F.1A12	BioLegend
V β 8.1, 8.2 TCR FITC	MR5-2	BD Bioscience
V β 8.1, 8.2 TCR PE	MR5-2	BD Bioscience

3.5. Puffer

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
1x ACK	NH ₄ Cl 150mM KHCO ₃ 10mM EDTA 100mM
MACS-Puffer	1x PBS 0,5% BSA 2.5 mM EDTA
Saponin-Puffer	1x PBS 1% BSA 0,5% Saponin
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
Perm/Wash™ 10x	1 Anteil Perm/Wash™ 10x

3.6. Versuchstiere

Die Versuchsmäuse wurden unter keimarmen Bedingungen in der Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gezüchtet und gehalten. Die Durchführung aller Tierexperimente unterlag der 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 x tg4) F1 – CD45.1/2	C57BL/6 x B10.PL	
(Foxp3gfp.K1 x tg4) F1	C57BL/6 x B10.PL	
(CRP-MBP x <i>cd4</i> -DN-IL10R x tg4) F1	C57BL/6 x B10.PL	
CRP-MBP x tg4 hCD2-ΔκTβR II	C57BL/6 x B10.PL	TGF-β-insensitive T Zellen (verfügen über einen dominant-negativen TGF-β-Rezeptor II)
(CRP-MBP SAP-IFN-γ x tg4) F1	C57BL/6 x B10.PL	Überexpression von IFN-γ (unter Kontrolle des SAP-Promoters)
(CRP-MBP x B10.PL) F1 – CD45.1/2	C57BL/6 x B10.PL	
(B6.SJL/BoyJ x B10.PL) F1 – CD45.1/2	C57BL/6 x B10.PL	
(C57BL/6 x tg4) F1	C57BL/6 x B10.PL	
B6.SJL/BoyJ x foxp3gfp	C57BL/6	

3.7. Software

Produktbezeichnung	Hersteller
FACS Diva6	BD Pharmingen, Heidelberg
GraphPad Prism®	GraphPad Software, Inc., San Diego, USA

3.8. Zellaufreinigung

3.8.1. Isolation von CD4+ T Lymphozyten aus der Milz

Die Mäuse wurden vor Organentnahme narkotisiert (Ketamin: Rompun: PBS = 1: 0,8: 1; 200µl/Maus, intraperitoneal) und durch cervikale Dislokation getötet. Alle weiteren Schritte wurden unter sterilen Bedingungen mit steril filtrierten Medien durchgeführt. Zudem wurde generell auf Eis gearbeitet. Nach Entnahme wurden die Milzen durch ein Sieb (Ø 100µm) gerieben und die Zellen in einem 50ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Das Gefäß wurde mit PBS aufgefüllt und unter Standardbedingungen zentrifugiert (430G, 5min, Raumtemperatur). Der Überstand wurde abpipettiert. Für die darauffolgende Erythrozytenlyse wurde das verbleibende Zellpellet in 1ml ACK-Puffer resuspendiert und unter Schwenken 1min inkubiert. Zum Abstoppen der Lyse wurde das Gefäß mit PBS aufgefüllt und die Zellsuspension anschließend durch eine weiteres Sieb (Ø 40µm) gegeben. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das Zellpellet in 1ml PBS resuspendiert und die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Isolation der CD4+ T Lymphozyten gelang über das „Magnetic Activated Cell Sorting“ (MACS). Die Zellen wurden nach weiterer Zentrifugation in MACS-Puffer (1ml/10⁸ Zellen) aufgenommen und mit anti-CD4 magnetischen Micro Beads (100µl/10⁸ Zellen) für 10min bei 4°C inkubiert. Nach dem anschließenden Waschen der Zellen erfolgte eine Resuspendierung in MACS-Puffer (1ml/10⁸ Zellen). Pro Probe wurden zwei LS-Säulen in den Magnetständer eingespannt und mit jeweils 3ml kaltem MACS-Puffer äquilibriert. Die Proben wurden auf die erste Säule aufgetragen und nach dem Durchfluss wurden die Säulen dreimalig mit 3ml MACS-Puffer gespült. Der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend folgte das Eluieren der magnetisch an die Säule gebundenen CD4+ T Lymphozyten. Zu dem Zweck wurde die erste Säule aus dem Magnetfeld entfernt, 5ml MACS-Puffer hinzugegeben und mittels Stempel der Inhalt der ersten Säule auf die sich im Magnetfeld befindliche zweite Säule gedrückt. Auch hier erfolgte eine dreimalige Spülung mit je 3ml MACS-Puffer und die Elution, etwa in ein steriles 15ml

Reagiergefäß. Die Reinheit der isolierten CD4+ T Zellen betrug 95%.

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

Die Gewinnung der Einzelzellsuspensionen samt Erythrozytenlyse erfolgte wie oben beschrieben. Nach dem Waschen der Zellen wurden diese in MACS-Puffer resuspendiert (1ml/10⁸ Zellen) und mit PE-markierten anti-CD25 AK (10µl/ml/10⁸ Zellen) für 10min bei 4°C inkubiert. Anschließend folgte das Waschen, Resuspendieren in MACS-Puffer und eine weitere Inkubation mit anti-PE magnetischen MicroBeads (10µl/ml/10⁸ Zellen). Nach erneutem Waschen wurden die Zellsuspensionen auf äquilibrierte LS-Säulen aufgetragen. In der Säule wurden CD25+ Zellen magnetisch zurückgehalten, sodass der Durchfluss aufgefangen wurde. Sollten CD25+ gewonnen werden, wurden diese aus der Säule eluiert. Im anderen Fall wurden die im Durchfluss befindlichen CD25- Zellen aufgefangen. Anschließend wurde nach Protokoll (siehe oben) weiter hinsichtlich der CD4-Positivität sortiert.

3.8.3. Isolation von CD3- Antigen-präsentierenden Zellen (APC)

Für die Gewinnung der APC wurden Milzen wie oben dargestellt zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet und die Erythrozyten lysiert. Anschließend wurden die Zellen in 1ml MACS-Puffer resuspendiert (10⁸ Zellen/ml) und mit FITC-markierten anti-CD3AK (20µl/ml) bei 4°C für 10min inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 2ml MACS-Puffer aufgenommen und anti-FITC MicroBeads (100µl/ml) hinzugefügt. Nach 10-minütiger Inkubation bei 4°C und erneutem Waschen wurden die Zellen auf eine vorher äquilibrierte LS-Säule aufgebracht und wie oben beschrieben mit MACS-Puffer gespült. Der Durchfluss, die CD3- APC, wurde aufgefangen.

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

Die Milzen wurden wie oben dargestellt zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet und die Erythrozyten lysiert. Anschließend wurden die Zellen in MACS-Puffer resuspendiert (10⁸ Zellen/ml) und mit CD11c-Magnetbeads (25µl/ml) bei 4°C für 15min inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen auf eine vorher äquilibrierte LS-Säule aufgebracht und wie oben beschrieben mit MACS-Puffer gespült. Im Anschluss wurden die CD11c+ Zellen aus der Säule

eluiert. Die Reinheit der Zellen betrug über 90%.

3.8.5. Isolation nicht-parenchymatöser Zellen (NPC) aus der Leber

Die Versuchstiere wurden vor Organentnahme narkotisiert (Ketamin: Rompun: PBS = 1: 0,8: 1; 200µl/ Maus, intraperitoneal) und mittels cervikaler Dislokation getötet. Nach Eröffnung des Peritoneums wurden die Lebern ca. 20sec über die Vena portae mit PBS perfundiert (6ml/min), anschließend freipräpariert und die Gallenblase entfernt. Alle weiteren Schritte wurden mit steril filtrierten Medien unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Lebern wurden durch ein Sieb (Ø 100µM) gerieben und die Zellen in einem 50ml-Reagiergefäß aufgefangen. Die mit PBS aufgefüllte Zellsuspension wurde zentrifugiert (40G, 4min, Raumtemperatur), um die im Überstand befindlichen NPC zu pelletieren. Der Überstand wurde in ein neues 50ml-Reagiergefäß überführt und ein weiteres Mal zentrifugiert (40G, 4min, Raumtemperatur). Der daraufhin abgenommene Überstand wurde nach Überführen in ein neues Reagiergefäß mit einer erhöhten Drehzahl zentrifugiert (430G, 7min, RT), um ein Pellet der NPC zu gewinnen. Das Zellpellet wurde in 4,5ml PBS aufgenommen und die Suspension in ein 15ml-Reagiergefäß überführt, in das bereits 2,5ml raumtemperiertes Optiprep vorgelegt wurde. Nach vorsichtigem Mischen wurde die Zellsuspension mit 1ml PBS überschichtet und 20min bei 400G (RT) ohne Bremse zentrifugiert.

Die Interphase mitsamt der nicht-parenchymatösen Zellen wurden entnommen und in ein neues 15ml-Reagiergefäß überführt. Nach der Erythrozyten-Lyse mittels ACK-Puffer (siehe oben) folgte die Zentrifugation (400G, 5min, RT), Aufnahme des Zellpellets in 1ml PBS und anschließende Lagerung bei 4°C bis zur weiteren Verarbeitung.

3.9. Zellkultur

3.9.1. Zellzahlbestimmungen

Zellzahlen wurden mit Hilfe der Neubauer Zählkammer erhoben. Die Verdünnung der Zellsuspension erfolgte entsprechend der zu erwartenden Zellzahl in einer Trypanblaulösung (1:10 Trypanblau/PBS). Danach wurden die Zählproben in die Neubauer-Zählkammer pipettiert und mit Hilfe eines Lichtmikroskops je zwei diagonal gegenüberliegende Großquadrate ausgezählt. Bei sehr niedrigen Zellzahlen erfolgte die Auszählung aller vier Großquadrate. Durch die Blaufärbung toter Zellen wurde außerdem die Bestimmung der Zellvitalität

ermöglicht. Anschließend wurde die Gesamtzellzahl nach folgender Formel ausgerechnet:

Gesamtzellzahl = gezählte Zellzahl / 2 x Verdünnungsfaktor x Volumen Zellsuspension x 10^4
Kammerfaktor

3.9.2. Zellkulturmedien

Für die Kultur frisch isolierter CD4⁺ T Zellen aus Milz und Leber, gegebenenfalls als Kokultur mit Antigen-präsentierenden Zellen (APC), wurde mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% L-Glutamin angereichertes IMDM-Medium verwendet. Im Rahmen der Proliferationstests bzw. Suppressionsassays wurde mit Click's-Medium gearbeitet, das mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 2% L-Glutamin (20ml/l) und β -Mercaptoethanol (0.04mM) angereichert wurde.

3.9.3. Restimulation der Zellen zur Detektion von Zytokinen im Zellkulturüberstand

Für die Restimulation der CD4⁺ T Zellen wurden diese nach Zentrifugation in Kulturmedium IMDM (10% FCS, 1%P/S, 1%L-Glutamin) aufgenommen (2×10^6 Zellen/ml) und in eine 96well-Zellkulturplatte mit einem Füllungsvolumen von 250 μ l/well überführt. Um die Zellen unspezifisch zu stimulieren wurden entweder anti-CD3 AK und anti-28 AK (je 2 μ g/ml) löslich hinzugegeben, bzw. nur anti-CD3 AK und 5×10^4 DC (CD11c⁺). Für eine Antigen-spezifische Stimulation wurden 5×10^4 DC (CD11c⁺) und ein modifiziertes, N-terminal acetyliertes Peptid des Myelischen Basischen Proteins (4YMBP) hinzugefügt (50-100ng/ml). Nach 24h bzw. 72h wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und für weitere Analysen bei -20°C eingefroren.

3.9.4. Restimulation für die intrazelluläre Zytokinfärbung

Für die Restimulation wurden die CD4⁺ T Zellen in IMDM (10% FCS, 1%P/S, 1%L-Glutamin) aufgenommen (4×10^6 Zellen/ml Medium) und durch die Zugabe von Phorbol 12-mystrate 13-acetate (100ng/ml PMA und 1-2 μ g/ml Ionomycin) sowie Golgi Plug (1 μ l/ml) aktiviert und für 5-6h im Brutschrank inkubiert. Eine Antigen-spezifische Restimulation erfolgte durch Zugabe von MBP (100ng/ml) und Golgi Plug (1 μ l/ml) mit anschließender Inkubation.

3.10. Zellcharakterisierung

3.10.1. Vitalitätstest

Um tote Zellen zu detektieren, wurde mit Pacific Orange Succinidyl Ester (PacO-NHS) gefärbt. Dieser Farbstoff dringt in tote Zellen ein und bindet an freie Amine im Inneren der Zelle. Intakte Zellen bleiben ungefärbt, sodass eine Abgrenzung von toten möglich ist. Um die toten Zellen zu färben, wurde PacO-NHS im Verhältnis 1:1000 in PBS verdünnt und die Zellen in 200µl dieser Verdünnung resuspendiert. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 4°C für 25min in Dunkelheit. Die Zellen wurden daraufhin gewaschen und in 4% PFA fixiert (4°C, 15min) oder in PBS für weitere Färbungen aufgenommen.

3.10.2. Färbung von Oberflächenmarkern

Um die spezifischen Oberflächenantigene zu färben, wurden die Zellen in PBS/2%BSA aufgenommen (10^5 - 5×10^6 Zellen/100µl) und in 5ml Röhrchen überführt. Entsprechend der AK-Konzentrationen wurden die Zellen mit 1µl AK/Probe gefärbt und für 15min bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Nach Auffüllen der Röhrchen mit 1ml PBS/2%BSA folgte die Zentrifugation (472G, 5min). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit PFA fixiert (4%, 15min, 4°C). Im Anschluss wurden die Zellen gewaschen und entweder in 300µl PBS resuspendiert und bei 4°C in Dunkelheit gelagert oder eine intrazelluläre Zytokinfärbung durchgeführt. Falls auf zusätzliche Foxp3-Expression gefärbt werden sollte, wurde die Fixation der Zellen nach der Oberflächenfärbung ausgelassen.

3.10.3. Färbung von intrazellulären Zytokinen

Nach oben beschriebener Fixierung mit PFA wurden die Zellen zweimalig mit 1ml Saponinpuffer (PBS/2%BSA/0.5%/Saponin) gewaschen, um eine Permeabilisierung der Membran zu erreichen. Nach Verwerfen des Überstands wurden die Zellen in 50µl Saponinpuffer resuspendiert und mit 1-2µl anti-IFN-γ AK oder anti-IL17 AK inkubiert (über Nacht bei 4°C). Im Anschluss folgte ein erneutes Waschen mit 1ml Saponinpuffer, eine Resuspendierung mit 400µl PBS und die Lagerung bei 4°C in Dunkelheit.

3.10.4. Färbung von CD4+CD25+Foxp3+ regulatorischen T Zellen

Nach der Oberflächenfärbung von CD4 und CD25 folgte das Waschen der Zellen mit PBS und die Foxp3-Färbung mit Hilfe des Foxp3 Staining Buffer Sets (eBioscience) nach Herstellerangaben. Nach der Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen mit dem Permeabilisierungspuffer gewaschen, in 20µl Permeabilisierungspuffer resuspendiert und bei 4°C für 15min mit Fc-Block (0.2µl/ Probe) inkubiert. Im Anschluss wurde der Foxp3-AK ohne jeden weiteren Waschschrift hinzugefügt (1µl/ Probe) und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben erneut mit Permeabilisierungspuffer gewaschen, in 400µl PBS resuspendiert und bis zur Analyse im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

3.10.5. Färbung von CD49b+LAG-3+ Typ 1 regulatorischen T Zellen

Für die Färbung von CD49b+LAG-3+ Typ 1 regulatorischen T Zellen wurden die Zellen wie oben beschrieben in PBS aufgenommen und die AK CD49b und LAG-3 hinzugefügt (1µl AK pro Probe). Die Proben wurden dann für 15min bei 37°C und anschließend für weitere 15min bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Nach dem Waschen wurde weiter auf Foxp3-Expression gefärbt (siehe oben).

3.10.6. Proliferationstest

Für den Proliferationstest wurden isolierte T Zellen wie unten beschrieben mit CellTrace™ CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) oder CellTrace™ Violet Stain angefärbt. Da die Fluoreszenzintensität des Farbstoffs bei jeder Zellteilung um die Hälfte abnimmt, kann mithilfe der Durchflusszytometrie ermittelt werden, wie oft eine Teilung der Zellen stattgefunden hat. Verlaufen die Teilungen synchron, lassen sich mehrere definierte Peaks darstellen. Um die Proliferation der T Zellen zu testen, wurden die gefärbten Zellen an Tag 3 geerntet, gegebenenfalls mit Oberflächenmarkern angefärbt (siehe oben) und durch Zugabe von 4% PFA bei 4°C für 15min fixiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, in 300µl PBS aufgenommen und bei 4°C dunkel gelagert.

3.10.6.1. CellTrace™ CFSE-Färbung

Die isolierten Zellen wurden in 1ml PBS resuspendiert (bis 5×10^7 Zellen), der CFSE-Stock

nach Herstellerangaben vorverdünnt und davon 4µl zu den Zellen gegeben. Die Suspension wurde gevortext und bei 37°C für 6min im Schüttler inkubiert. Um die Färbereaktion abzustoppen wurde 1ml FCS hinzugegeben. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal gewaschen und in Kulturmedium aufgenommen. Zusätzlich wurde bei den Färbungen eine Probe entnommen, um die gleichmäßige Färbung der Zellen und die Fluoreszenzintensität ungeteilter Zellen zu messen.

3.10.6.2. CellTrace™ Violet Stain-Färbung

Die isolierten Zellen wurden in 1ml PBS resuspendiert (bis 5×10^7 Zellen). Der nach Herstellerangaben vorverdünnte Farbstoff wurde im Verhältnis 1:4 mit PBS ein weiteres Mal verdünnt und die Zellen anschließend mit CellTrace gefärbt (1µl/ $1-5 \times 10^7$ Zellen) und bei 37°C für 10min inkubiert. Danach wurde mit der 5-fachen Menge Click's-Medium (10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 2% l-Glutamin (20ml/l), β-Mercaptoethanol (0.04mM)) aufgefüllt und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Folgenden wurden die Zellen insgesamt dreimal mit Click's-Medium gewaschen und in Click's-Medium resuspendiert. Zusätzlich wurde bei den Färbungen eine Probe entnommen, um die gleichmäßige Färbung der Zellen und die Fluoreszenzintensität ungeteilter Zellen zu messen.

3.10.7. *In vitro* Suppressionsassay

Um die suppressive Kapazität von T regulatorischen Zellen und Typ 1 regulatorischen T Zellen zu testen, wurden Kokulturen der genannten Zellen mit CD4+CD25- Responder Zellen (Tresp) und CD3- APC angesetzt. Dabei werden Responder Zellen durch die APC-vermittelte Präsentation eines Antigens zur Proliferation angeregt. Durch die Anwesenheit der regulatorischen Zellen kann diese Proliferation jedoch supprimiert werden und so die Suppressionskapazität der regulatorischen T Zellen erfasst werden.

Für den Suppressionsassay wurden CD4+CD25- Tresp Zellen (siehe oben) aus der Milz isoliert, jeweils 1×10^6 Tresp/well in eine 96well-Mikrotiterplatte pipettiert und in 250µl Click's-Medium kultiviert. Die APC wurden wie oben beschrieben isoliert und anschließend durch Bestrahlung (30Gy) mitotisch inaktiviert und gezählt. Pro well wurden 4×10^6 der APC mit den Tresp kokultiviert. Je nach Versuchsaufbau erfolgten unterschiedliche Stimulationen: Im Suppressionsassay mit Tregs wurde mit anti-CD3 AK (2µg/ml) stimuliert; um die suppressive

Kapazität der Tr1-Zellen zu testen, wurde in einem Antigen-spezifischen Ansatz MBP (10ng/ml) hinzugefügt, in einem anderen unspezifischen Ansatz anti-CD3 AK und anti-CD28 AK (je 2µg/ml).

Zur Gewinnung der T regulatorischen Zellen wurden aus Milzen wie oben beschrieben Einzelzellsuspensionen hergestellt, jedoch keine Erythrozytenlyse durchgeführt. Als Medium wurde Click's-Medium verwendet. Für den Tr1-Suppressionsassay wurden die CD4+CD25- T Zellen wie oben beschrieben magnetisch separiert und wie beschrieben hinsichtlich der Oberflächenmarker CD49b und LAG-3 gefärbt. Mittels Durchflusszytometrie wurden daraufhin die CD49b+LAG-3+ doppelt positiven Zellen gesortet. Für das Treg-Suppressionsassay wurden die Foxp3+ Zellen aus der Einzelzellsuspension per Durchflusszytometrie anhand des Markers foxp3gfp gesortet. Anschließend wurden entweder die CD4+CD25-CD49b+LAG-3+ Tr1 Zellen oder die CD4+CD25+Foxp3+ Treg Zellen in absteigender Zellzahl (1×10^6 , 5×10^5 , 25×10^4 , $12,5 \times 10^3$, 0) zu den Tresp hinzugefügt (Verhältnis Tresp:Treg: 1:1, 2:1, 4:1, 8:1, 1:0). Im Anschluss erfolgte die Inkubation der befüllten Mikrotiterplatten im Brutschrank bei 37°C. Nach 72h wurden die Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt, unter Standardbedingungen gewaschen und mit Pac-O-NHS, anti-CD4, anti-CD45.1 und anti-CD45.2 gefärbt. Bis zur Analyse wurden die Proben mit 1%PFA fixiert und bei 4°C in Dunkelheit gelagert. Die Zellteilungen der Tresp wurden mittels Proliferationstest analysiert.

3.10.8. Durchflusszytometrie: Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS)

Die gefärbten und fixierten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie (LSR II, FACS Canto) analysiert. Um das Ineinanderstrahlen der unterschiedlichen Fluoreszenzkanäle zu kompensieren, wurden für die verschiedenen Fluorochrome Einzelfärbungen angefertigt und zur Berücksichtigung der Autofluoreszenz ungefärbte Zellen aufgenommen. Desweiteren wurden Isotypkontrollen angefärbt, um die Hintergrundfluoreszenz der verwendeten Antikörper zu erfassen. Dubletten und tote Zellen wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Die Messungen wurden mit der BD FACSDiva Software 6 ausgewertet.

3.10.9. Zytokinbestimmung im Zellkulturüberstand: Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Zytokinmessungen erfolgten mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), wobei

zwei verschiedene Antikörper verwendet werden, die jeweils spezifisch das gleiche Antigen über unterschiedliche Epitope erkennen. Hierfür werden die Kavitäten („wells“) einer Mikrotiterplatte ausplattiert. Die zu detektierende Substanz wird über den Erstantikörper in den wells gebunden. Nach der Inkubation mit dem biotinylierten Zweitantikörper und Streptavidin-gekoppelter Meerrettich-Peroxidase kommt es nach Substratzugabe zu einem Farbumschlag, der photometrisch gemessen wird. Bei jeder Messung wird ein Standard mitgeführt, sodass sich die gemessene optische Dichte in eine Proteinkonzentration umrechnen lässt. Die Messungen wurden mit KITS von R&D System entsprechend der beiliegenden Protokolle durchgeführt. Als Substratlösung wurde Tetramethylbenzidin (TMB Plus READY-TO-USE, fertige Gebrauchslösung) verwendet. Anschließend wurden die Proben mit dem ELISA-Auslesegerät „Opsys MRX TC II“ (Dytec Technologies GmbH) bei einer Wellenlänge von 450nm ausgelesen und die Proteinkonzentrationen bestimmt.

3.10.10. Bestimmung der absoluten CD4+ T Zellzahl in der Leber

Um die absolute Zellzahl der CD4+ T Zellen in der Leber zu bestimmen, wurde für jede Probe die gezählte Anzahl nicht-parenchymatöser Zellen mit dem prozentualen Anteil der CD4+ T Zellen multipliziert. Die CD4+ T Zellen wurden im Vorfeld mittels Oberflächenfärbung und Durchflusszytometrie detektiert.

3.11. Histologie

3.11.1. Fixation, Entwässerung und Paraffin-Einbettung

Für die histologische Analyse wurde ein Stück des rechten Leberlappen (Lobus dexter) nach Organentnahme in ein 15ml Regiergefäß mit 3ml Formalin (4%, pH 7,5) überführt und für 24 Stunden fixiert. Nach dem Dekantieren folgte die Inkubation in 3ml Wasser für 2 Stunden und darauffolgend die Organentwässerung mithilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (Isopropanol 20%, 40%, 70%) für jeweils eine Stunde. Die Lagerung bis zur Paraffineinbettung erfolgte in Isopropanol (70%) bei RT. Die Einbettung wurde im pathologischen Institut des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Die Paraffinblöcke wurden mithilfe eines Mikrotoms mit einer Schnittdicke von 3µm geschnitten, in einem Wasserbad (40°C) auf einen Objektträger aufgebracht und auf einer Wärmeplatte (40°C) über Nacht getrocknet.

3.11.2. Hämatoxilin-Eosin-Färbung

Die Objektträger mit den getrockneten Organschnitten wurden in drei aufeinanderfolgenden Xylolbädern (96%) für 5min und danach in einer absteigenden Alkoholreihe (Ethanol 100%, 90%, 70%, 50%) für jeweils 4min inkubiert. Nach einer Überführung in Wasser (Aqua dest.) für 2min, erfolgte das Bad in Hämalaunlösung (sauer nach Mayer) für 20min, das kurze Spülen mit Aqua dest. und das Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 30min. Nach 2-minütiger Inkubation in Aqua dest. wurden die Schnitte für 1min in Eosin (0,5%, 1 Tropfen Essig auf 100ml) überführt, erneut mit Leitungswasser kurz gespült und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe inkubiert (Ethanol, 5sec in 50%, 30sec in 70%, 1min in 90%, 2min in 100%, erneut 3min in 100%). Zuletzt folgte die Überführung in drei aufeinanderfolgende Xylolbäder (96%) für 3min und das Eindecken der gefärbten Schnitte mit Eindeckmedium (Entellan), sowie der Versiegelung durch ein Deckglas.

3.12. Tierexperimentelle Arbeiten

3.12.1. Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis: MBP-Immunisierung

Um eine autoreaktive inflammatorische Reaktion in den Versuchstieren zu induzieren, wurde mit dem Myelin Basischen Protein (MBP) immunisiert. MBP wird normalerweise im ZNS exprimiert. Mäuse der Linie CRP-MBP weisen jedoch eine zusätzliche Expression dieses Autoantigens in der Leber auf. Eine Immunreaktion gegen das MBP kann in diesen Mäusen daher kurzfristig zu Entzündungsgeschehen in der Leber führen und mittelfristig die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis auslösen.

Zur MBP-Immunisierung wurden die geschlechts- und altersgematchten Versuchstiere mit einer Emulsion bestehend aus Complete Freund Adjuvant (CFA), das zusätzlich mit hitzeinaktiviertem Mycobacterium tuberculosis angereichert wurde (eine Ampulle auf zwei Ampullen CFA), und 4YMBP-Peptid (200µg/50µl PBS) immunisiert (MBP:CFA= 1:1). Die Injektion erfolgte dabei subkutan nahe der Schwanzwurzel (100µl). Zusätzlich wurde am gleichen Tag, sowie 2 Tage nach Immunisierung, Pertussis Toxin (200ng/250µl PBS) intraperitoneal (i.p.) verabreicht.

3.12.2. Beurteilung der EAE

Zur Beurteilung der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) wurden die klinischen Symptome ab Tag 7 nach MBP-Immunisierung täglich mit Hilfe eines 5-stufigen, klinischen EAE-Scores erhoben: 0: keine Symptome; 1: schlapper Schwanz; 2: wackelnder Gang; 3: Hinken der Hinterläufe; 4: komplette Lähmung der Hinterläufe; 5: moribund. Das Scoring erfolgte maximal bis Tag 30 nach Immunisierung.

3.12.3. Autoimmune Hepatitis im Mausmodell

3.12.3.1. 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, wurde histologisch die portale und parenchymatöse Lymphozyteninfiltration verblindet begutachtet. Darüber hinaus erfolgte die Befundung durch einen Pathologen nach dem modifizierten histologischen Aktivitätsindex mHAI nach Ishak et al. (Ishak et al. 1995). Er setzt sich zusammen aus der Beurteilung der 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 Hämatoxilin-Eosin gefärbten Schnitte der Leber wurden verblindet ausgewertet.

3.12.3.2. Serum-Transaminasenmessung

Für die Transaminasenmessung wurde das Vollblut durch Punktion der Vena cava inferior entnommen und in ein heparinisiertes 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation (3000RPM, 4°C, 10min) wurden pro Maus 100-200µl Plasma als Überstand abgenommen. Die Transaminasenmessung erfolgte durch das Institut für Klinische Chemie / Zentrallaboratorien am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

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

Für den Transfer von CD4+ T Zellen wurden CD4+ T Zellen aus Milzen von tg4 Spendertieren isoliert (siehe oben). Die gewonnenen CD4+ T Zellen wurden dann in PBS überführt, gezählt und pro Empfängertier wurden $5-10 \times 10^6$ CD4+ T Zellen in 150 μ l PBS intravenös transferiert. Die Empfängertiere wurden einen Tag zuvor mit MBP/CFA immunisiert, um eine EAE zu induzieren (Abb.1). Eine Identifizierung der Spenderzellen erfolgte anhand des Oberflächenmarkers CD45: Die Zellen der Spendertiere waren CD45.2 positiv, die der Empfänger hingegen CD45.1 und CD45.2 positiv.

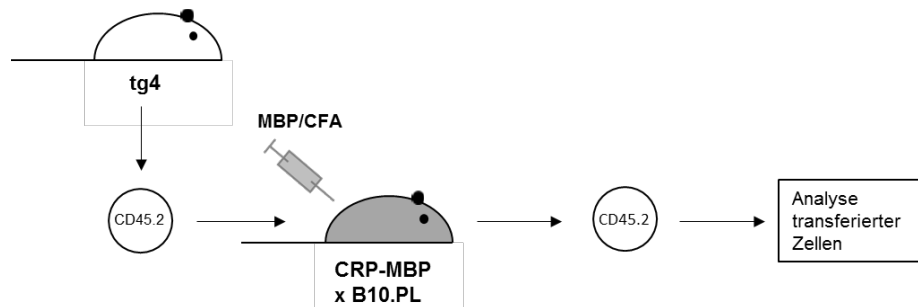


Abb.1: Transfer nicht-toleranter MBP-spezifischer CD4+ T Zellen und EAE-Induktion durch MBP-Immunisierung.

3.12.5. *In vivo* Treg-Depletion mittels Injektion von anti-mouse-CD25 Antikörper (PC-61.5.3)

Um CD4+CD25+Foxp3+ Treg *in vivo* zu depletieren, wurden 500 μ g PC-61 in 200 μ l PBS gelöst und den Versuchstieren i.p. verabreicht. Die Injektionen wurden zwei Mal wöchentlich wiederholt.

3.12.6. IL-10-Rezeptor Blockade mittels Injektion von anti-IL-10-Rezeptor Antikörper

Um den IL-10-Rezeptor (CD210) *in vivo* zu blockieren, wurden 0,15ng anti-CD210 AK in 150 μ l PBS gelöst und den Versuchsmäusen i.p. verabreicht. Die Injektion erfolgte einmal wöchentlich.

3.13. Statistische Auswertungen

Die graphische und statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software GraphPadPrism®. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte angegeben und graphisch als Mediane dargestellt. Die Signifikanz wurde über den Mann-Whitney-Test mit einem 95%-Konfidenzintervall getestet und der p-Wert berechnet ($p < 0,05$ = signifikant).

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung des CRP-MBP x tg4 Mausmodells

4.1.1. Analyse von CRP-MBP x tg4 Mäusen ohne Vorbehandlung

Zunächst sollte untersucht werden, ob die Versuchstiere der Linie CRP-MBP x tg4 in der Peripherie MBP-spezifische T Zellen aufweisen. Dies wurde mithilfe einer durchflusszytometrischen Bestimmung der für den transgenen T Zell-Rezeptor charakteristischen V β 8.2-Expression durchgeführt. Außerdem galt es zu prüfen, ob die MBP-spezifischen T Zellen durch die hepatische MBP-Expression bereits tolerant wurden oder zu pro-inflammatorischen Zellen differenzieren konnten. Weiter sollte überprüft werden, ob in den CRP-MBP x tg4 Mäusen eine idiopathische Leberentzündung vorlag und somit die MBP-spezifischen CD4⁺ T Zellen das in der Leber exprimierte Antigen erkannten und ohne zusätzliche Aktivierung eine entzündliche Effektorantwort generierten. Zu diesem Zweck sollte ebenso der Anteil an Zytokin-produzierenden CD4⁺ T Zellen gemessen werden. Da CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatorische T Zellen einen relevanten tolerogenen Faktor darstellen, wurden die Frequenzen dieser Zellen überprüft. Eine weitere CD4⁺ T Zell-Subpopulation, deren potenzielle tolerogene Kapazität diskutiert wird, sind die Typ 1 regulatorischen T Zellen. Auch ihre Frequenzen wurden anhand der Oberflächenmarker CD49b und LAG-3 erfasst. Als Kontrollgruppe dienten Mäuse der Linie tg4 x C57BL/6, die ebenfalls über den MBP-spezifischen T Zell Rezeptor verfügen, nicht jedoch das MBP in der Leber exprimieren.

In der Analyse zeigte sich, dass nahezu alle CD4⁺ T Zellen in der Milz über die V β 8.2-Kette verfügen, die für den MBP-spezifischen T Zell-Rezeptor charakteristisch ist und somit potenziell in der Lage sind eine spezifische Immunantwort gegen MBP zu richten (CRP-MBP x tg4: 99,72% vs. C57BL/6 x tg4: 99,7% p=0,8810, n=5 vs. 4) (Abb.2). Dies konnte durch Wiederholungsversuche verifiziert werden.

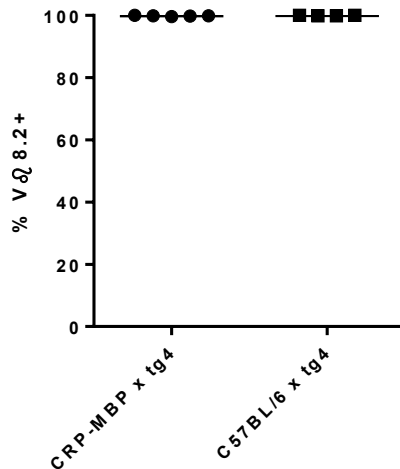


Abb.2: Anteil der VB8.2+ Zellen an CD4+ T Zellen aus der Milz. Analyse ohne Vorbehandlung der Versuchstiere.

Für die Überprüfung, ob die Zellen pro-inflammatorische Effektorantworten generieren können, wurden die Zellen *in vitro* stimuliert. Um auszuschließen, dass vorhandene T regulatorische Zellen die induzierte Stimulation inhibieren, wurden CD4+CD25- T Zellen isoliert. Für eine Stimulation werden bestimmte Signale, einerseits über den T Zell-Rezeptor, andererseits über weitere kostimulatorische Moleküle, benötigt. Diese Signale sind ausreichend vorhanden, wenn die Aktivierung über dendritische Zellen (DC) stattfindet. Für eine DC-unabhängige unspezifische Stimulierung werden sowohl anti-CD3 Antikörper (AK), als auch anti-CD28 AK benötigt. Es sollte untersucht werden, ob die Zellen sowohl Antigen-spezifisch als auch – unspezifisch stimulierbar sind. Für eine Antigen-spezifische Stimulierung wurden 5×10^5 CD4+CD25- T Zellen aus der Milz ausgesät, mit 5×10^4 DC kokultiviert und Antigen-spezifisch unter Hinzugabe von 50 bzw. 100ng/ml MBP Ac1-9 Peptid stimuliert. Für die unspezifische Aktivierung wurden entweder, anstelle des MBP, $2 \mu\text{g/ml}$ anti-CD3 AK hinzugegeben oder aber die CD4+CD25- T Zellen mit je $2 \mu\text{g/ml}$ antiCD3/28 AK stimuliert in Abwesenheit von DC. Nach 96h wurden die Überstände entnommen und die Zytokinproduktion mittels ELISA gemessen. In der Gruppe der CRP-MBP x tg4 Mäuse war eine Produktion von IFN- γ nach 96h messbar, es bestand aber kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe, weder nach Stimulierung mit 50ng/ml MBP (CRP-MBP x tg4: 315,3pg/ml vs. C57BL/6 x tg4: 256.6pg/ml, $p=0,8286$, $n=6$ vs. 4), noch nach unspezifischer Stimulation (CRP-MBP x tg4: 1241pg/ml vs. C57BL/6 x tg4: 1221pg/ml, $p=0,9571$, $n=6$ vs. 4) (Abb.3 A+B). Des Weiteren lag sowohl in den CRP-MBP x tg4 Mäusen, als auch in der Kontrollgruppe eine Produktion von IL-17 nach MBP-Stimulierung (CRP-MBP x tg4: 162pg/ml vs. C57BL/6 x tg4: 110pg/ml, $p=0,3095$, $n=5$)

und unspezifischer Stimulierung vor (CRP-MBP x tg4: 179pg/ml vs. C57BL/6 x tg4: 108pg/ml, $p=0,4127$, $n=5$) (Abb.3 C+D). Dies konnte in einem Wiederholungsversuch bestätigt werden. Aufgrund der stark variierenden ELISA-Messwerte der Zytokinproduktionen zwischen den Versuchen, sollten jedoch weitere Wiederholungen stattfinden, um die Werte zu verifizieren.

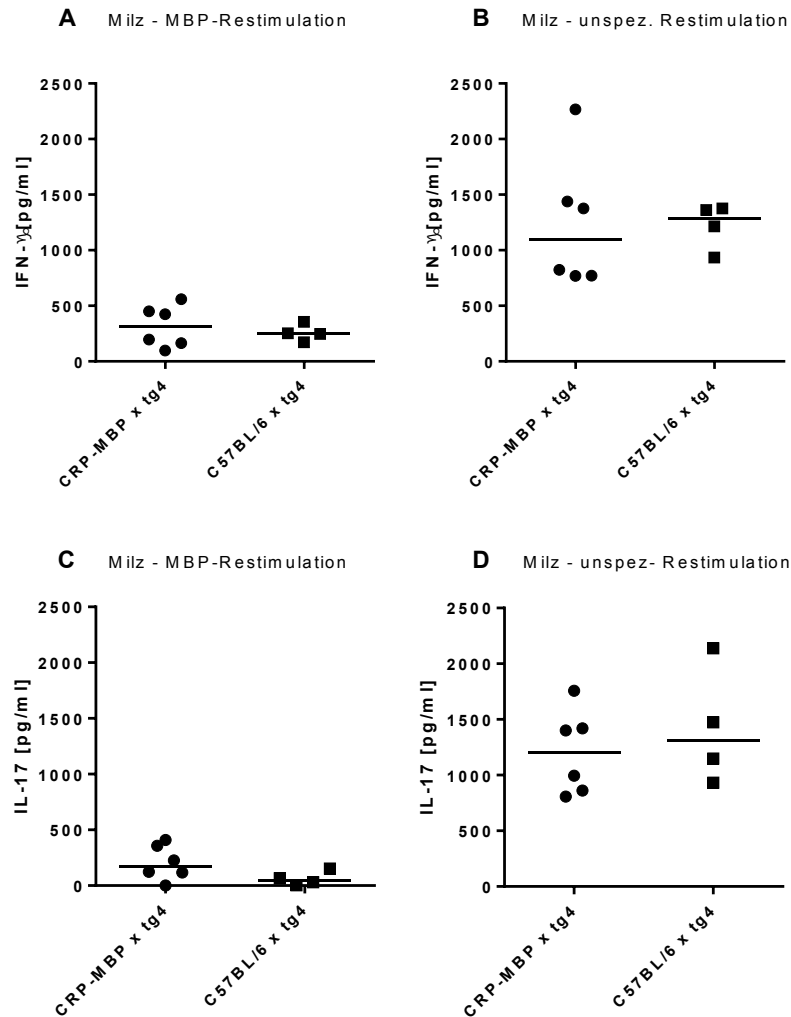


Abb.3: IFN- γ und IL-17 im Zellkulturüberstand nach 96h Restimulation von CD4+CD25- T Zellen (5×10^5) aus der Milz in Anwesenheit von DC (5×10^4). A+C: MBP-Restimulation (50ng/ml MBP). B+D: unspezifische Restimulation ($2 \mu\text{g/ml}$ anti-CD3 AK). Analyse ohne Vorbehandlung der Versuchstiere.

Als weiterer Parameter wurde der Anteil von IFN- γ - und IL-17-produzierenden Zellen an der CD4+ T Zell-Population mittels Durchflusszytometrie erhoben. Hierfür wurden die isolierten CD4+ T Zellen unspezifisch für 6h Stunden mit PMA/Ionomycin stimuliert und anschließend die zu detektierenden Zytokine intrazellulär gefärbt. Hierbei lag der Anteil der IFN- γ -produzierenden CD4+ T Zellen aus der Leber deutlich höher als aus der Milz (Milz: CRP-MBP x tg4: 9,7% vs. C57BL/6 x tg4: 6,7%, $p=0,1508$, $n=5$; Leber: CRP-MBP x tg4: 29,3% vs.

C57BL/6 x tg4: 31,48%, p=0,6429, n=5) (Abb.4 A+B). Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bestätigt werden.

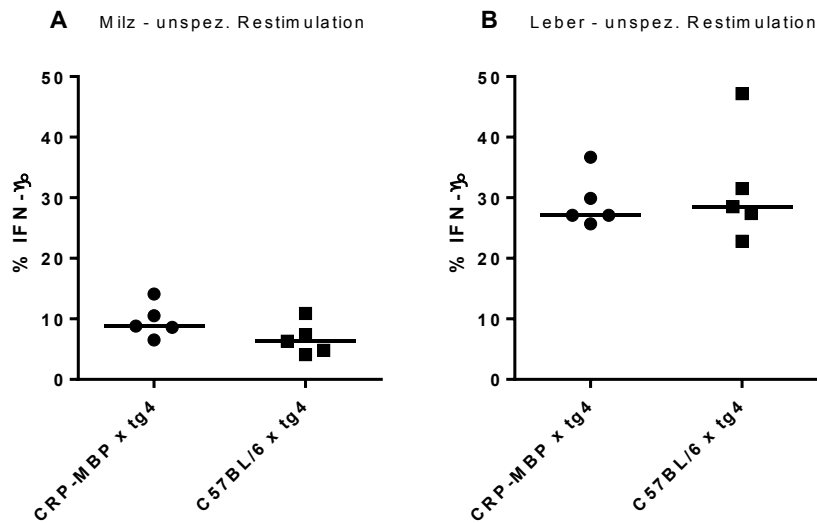


Abb.4: Anteil der IFN- γ -produzierenden Zellen an CD4⁺ T Zellen nach 6h unspezifischer Restimulation (100ng/ml PMA und 2 μ g/ml Ionomycin). A: Milzzellen. B: Leberzellen. Analyse ohne Vorbehandlung der Versuchstiere.

Auch der Anteil der IL-17-produzierenden CD4⁺ T Zellen lag in der Leber höher (ca. 4%) als in der Milz (ca. 1,5%). Doch auch hier war kein wesentlicher Unterschied zwischen den Gruppen erkennbar (keine Abbildung) Die Ergebnisse sind für einen weiteren Versuch repräsentativ. Insgesamt ist somit evident, dass die T Zellen der Linie CRP-MBP x tg4 unspezifisch und durch MBP Ac1-9 Peptid stimulierbar waren und vergleichbare pro-inflammatorische Effektorfunktion zeigten wie Zellen der Linie C57BL/6 x tg4.

Um den Entzündungsstatus in der Leber zu erheben, wurden die Lebern histologisch auf Infiltrate untersucht. In beiden Gruppen waren nur sehr vereinzelt Leberinfiltrate vorhanden, sodass keine akute Leberentzündung vorlag (keine Abbildung).

Dies wurde durch die Anzahl der isolierten Leberlymphozyten bestätigt, die bei rund zwei Millionen Zellen pro Leber lag und sich nicht signifikant zur Kontrollgruppe unterschied. (CRP-MBP x tg4: 2,13x10⁶ vs. C57BL/6 x tg4: 2,548x10⁶, p=0,2222, n=5) (keine Abbildung). Dies wurde dreimalig in voneinander unabhängigen Versuchen bestätigt. Des Weiteren wurde das Enzym Alanin-Aminotransferase (ALT) im Blutserum gemessen, das ein Marker für geschädigtes Lebergewebe ist. Die Messwerte waren in beiden Gruppen nicht pathologisch erhöht. (CRP-MBP x tg4: 58U/l vs. C57BL/6 x tg4: 14,5U/l, p=0,0857, n=6 vs. 4) (keine Abbildung).

Zusätzlich wurde der Anteil von CD4+ T Zellen an isolierten Zellen aus Leber und Milz mittels Durchflusszytometrie erfasst. Dieser lag bei zwei Versuchen in der Milz bei etwa über 10% und es waren keine Unterschiede zur Kontrollgruppe festzustellen (Milz: CRP-MBP x tg4: 10,9% vs. C57BL/6 x tg4: 12,6%, $p=0,2222$, $n=5$) (Abb.5A). Die Werte in der Leber variierten stärker zwischen den Versuchen, lagen tendenziell aber unter den Werten in der Milz (Leber: CRP-MBP x tg4: 7,4% vs. C57BL/6 x tg4: 7,9%, $p=0,6905$, $n=5$) (Abb.5B).

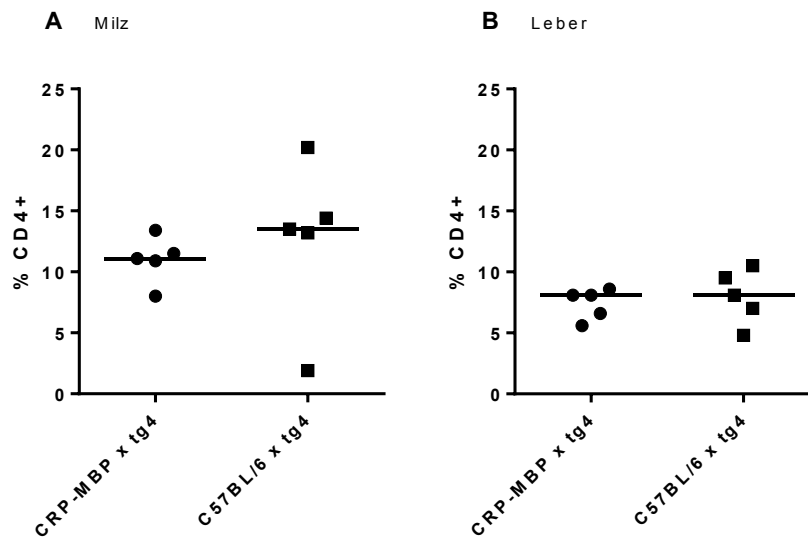


Abb.5: Anteil der CD4+ T Zellen an lebenden Gesamtzellen. A: Milzzellen. B: Leberzellen. Analyse ohne Vorbehandlung der Versuchstiere.

Die Frequenzen der CD4+Foxp3+ regulatorischen T Zellen wurden ebenfalls in Leber und Milz erhoben. Neben Foxp3, das als Marker für murine Treg eigentlich hinreichend ist, wurde zusätzlich die Population der CD25+Foxp3+ Treg erfasst, um eine differenziertere Charakterisierung zu ermöglichen. Bezüglich der CD25+Foxp3+ Treg (Anteil an CD4+ Zellen) zeigten sich bei Mäusen mit hepatisch exprimiertem MBP im Vergleich zur Kontrollgruppe höhere Frequenzen in der Milz (CRP-MBP x tg4: 3,72% vs. C57BL/6 x tg4: 3,48%, $p=0,5317$, $n=5$) (Abb.6A) und sogar mit signifikantem Unterschied in der Leber (CRP-MBP x tg4: 3,24% vs. C57BL/6 x tg4: 0,72%, $p=0,0079$, $n=5$) (Abb.6B). Die Unterschiede wurden auch in Hinblick auf den Anteil der Foxp3+ Treg an CD4+ T Zellen deutlich. In der Leber waren die Treg-Frequenzen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (CRP-MBP x tg4: 8,52% vs. C57BL/6 x tg4: 1,98%, $p=0,0079$, $n=5$) (Abb.6C). In einem weiteren Versuch konnte in der Milz ein Treg-Anteil an CD4+ T Zellen von rund 10% gemessen werden, allerdings auch in der Kontrollgruppe (CRP-MBP x tg4: 10,12% vs. C57BL/6 x tg4: 8,03%, $p=0,1048$, $n=6$ vs 4)

(Abb.6D). Vergleichbare Werte der Milzzellen zeigten sich auch bei einem Wiederholungsversuch.

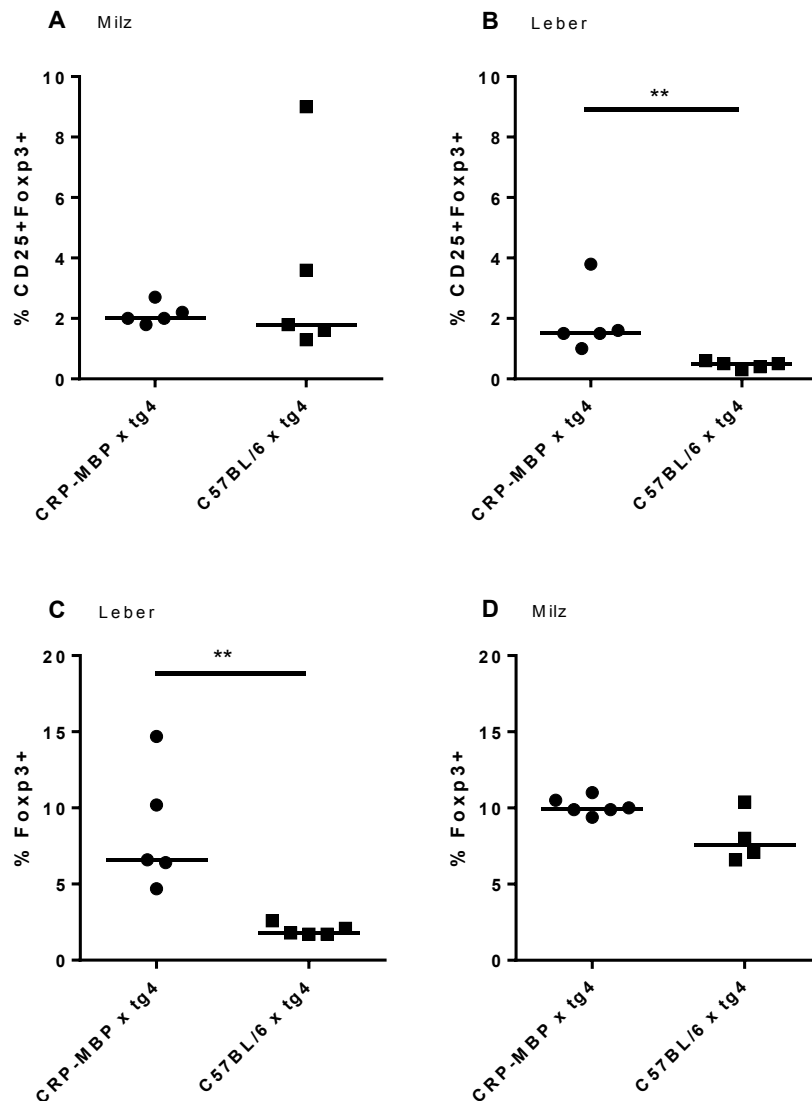


Abb.6: Anteil der CD25+Foxp3+ Treg und Foxp3+ Treg an CD4+ T Zellen. A+D: Milzzellen. B+C: Leberzellen. Analyse ohne Vorbehandlung der Versuchstiere.

Bei einer weiteren Versuchswiederholung wurden die Treg explizit hinsichtlich der MBP-Spezifität überprüft (Vß8.2-Kette). Hier war der Anteil der CD25+Foxp3+ Treg an MBP-spezifischen CD4+ T Zellen sowohl in der Milz als auch in der Leber erhöht (Milz: CRP-MBP x tg4: 7,38% vs. C57BL/6 x tg4: 6,05%, p=0,1714; Leber: CRP-MBP x tg4: 6% vs. C57BL/6 x tg4: 2,88%, p=0,0667, n=6 vs. 4) (Abb.7 A+B). Bezüglich der Foxp3+ Treg lag darüber hinaus ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe vor (Milz: CRP-MBP x tg4: 9,72% vs.

C57BL/6 x tg4: 7,5%, p=0,0429; Leber: CRP-MBP x tg4: 12,03% vs. C57BL/6 x tg4: 6,03%, p=0,0095, n=6 vs. 4) (Abb.7 C+D).

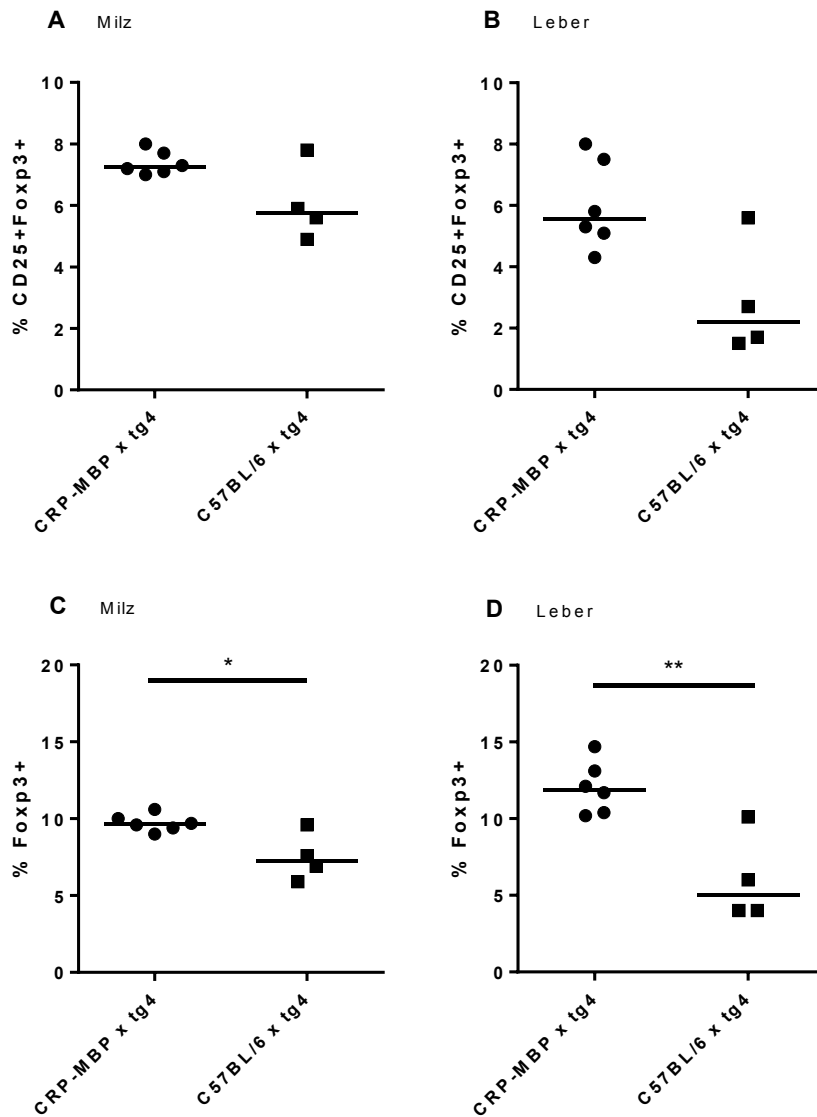


Abb.7: Anteil an CD25+Foxp3+ und Foxp3+ Treg an CD4+Vβ8.2+ T Zellen. A+C: Milzzellen. B+D: Leberzellen. Analyse ohne Vorbehandlung der Versuchstiere.

Um die Frequenzen der Typ 1 regulatorischen T Zellen zur erfassen, wurde der Anteil von CD49b+LAG-3+ Zellen an CD4+Foxp3- Zellen bemessen. Dieser Wert war jedoch in beiden Gruppen äußerst gering, sowohl in der Leber (CRP-MBP x tg4: 0,3% vs. C57BL/6 x tg4: 0,3%, p=0,6429, n=5), als auch in der Milz (CRP-MBP x tg4: 0,8% vs. C57BL/6 x tg4: 0,02%, p=0,4048, n=5) (keine Abbildung). Dies gilt ebenso für einen Wiederholungsversuch.

Die Ergebnisse zeigen, dass in den Mäusen mit hepatisch exprimiertem MBP kein idiopathisches entzündliches Geschehen in der Leber vorlag. Dennoch wurde evident, dass die

T Zellen MBP-spezifisch und unspezifisch stimulierbar waren. Bezüglich der T regulatorischen Zellen war die Tendenz erkennbar, dass in Mäusen der Linie CRP-MBP x tg4 höhere Treg-Frequenzen in der Leber vorhanden sind. Weiterführend sollte nun analysiert werden, ob die T Zellen in den CRP-MBP x tg4 Mäusen auch *in vivo* stimulierbar sind oder ob die Versuchstiere eine stabile Toleranz hinsichtlich EAE und Leberentzündung aufweisen. Aus diesem Grund sollte durch MBP-Immunsierung eine entzündliche Immunantwort gegen MBP generiert werden. Von besonderem Interesse war dabei, ob die Foxp3+ Treg einen effektiven Schutz vor Autoimmunität bieten können.

4.1.2. Analyse von CRP-MBP x tg4 Mäusen nach MBP-Immunsierung

In diesem Immunsierungsversuch galt es zu prüfen, ob die MBP-spezifischen T Zellen in CRP-MBP x tg4 Mäusen durch eine MBP-Immunsierung *in vivo* aktiviert werden können und diese Zellen fähig sind, entweder eine EAE oder Leberentzündung auszulösen. Zu diesem Zweck wurden CRP-MBP x tg4 Mäuse an Tag 0 mit MBP immunisiert und ab Tag 7 die klinischen Symptome anhand des EAE-Scores bis Tag 30 dokumentiert. Als Kontrollgruppe dienten auch hier Mäuse der Linie C57BL/6 x tg4, die über den MBP-spezifischen T Zell Rezeptor verfügen, jedoch kein MBP in der Leber exprimieren. Bezüglich der EAE-Induktion zeigte sich, dass die Tiere der Linie CRP-MBP x tg4 keine EAE-Symptome aufwiesen und folglich tolerant gegenüber der EAE-Induktion waren. Die Kontrollgruppe hingegen zeigte einen typisch monophasischen Krankheitsverlauf mit progredienter Symptomatik bis ca. Tag 20 nach Immunsierung (Abb.8).

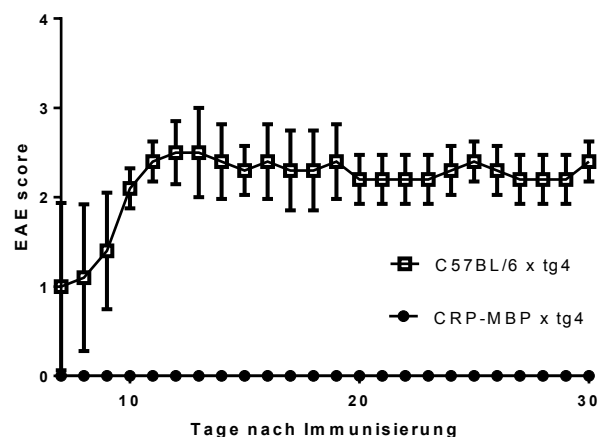


Abb.8: EAE-Verlauf nach Immunsierung mit MBP/CFA von Mäusen der Linie C57BL/6 x tg4 und CRP-MBP x tg4 (n=5 vs. 6).

Um zu untersuchen, ob auto-inflammatorische Vorgänge in der Leber vorlagen, fand in einem zweiten Versuchsaufbau die Analyse nach MBP-Immunsierung bereits an Tag 7 statt. In der Histologie waren in den CRP-MBP x tg4 Mäusen portal und parenchymal lymphozytäre Infiltrate in der Leber zu erkennen, dies jedoch auf moderatem Niveau (Abb.9A). Die Kontrollgruppe wies zwar tendenziell etwas weniger Infiltrate auf, es konnte aber kein deutlicher Unterschied festgestellt werden (Abb.9B). Auch in Wiederholungsversuchen waren die Gruppenunterschiede marginal, allerdings variierte der Grad der Entzündung zwischen den Versuchen.

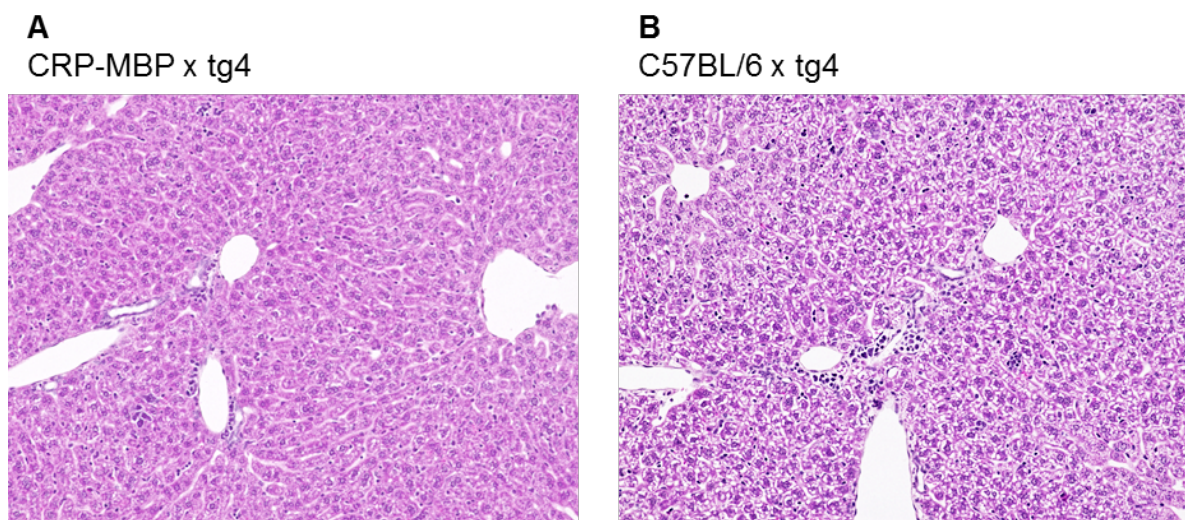


Abb.9: HE-Färbung der Leber nach MBP-Immunsierung an Tag 7 (Vergrößerung=x20; n=5). A: CRP-MBP x tg4 Mäuse. B: C57BL/6 x tg4 Mäuse.

Auch bei der Anzahl der Leberlymphozyten konnte kein wesentlicher Unterschied zwischen den CRP-MBP x tg4 Mäusen und der Kontrollgruppe festgestellt werden (CRP-MBP x tg4 $4,31 \times 10^6$ vs. C57BL/6 x tg4: $5,97 \times 10^6$, $p=0,1143$, $n=5$) (keine Abbildung). Dies wurde durch Wiederholung bestätigt. Der Wert der Serum-Transaminasen (ALT) war in beiden Gruppen im Normalbereich (keine Abbildung). Der Anteil von CD4+ T Zellen an Gesamtzellen war in den CRP-MBP x tg4 Mäusen niedriger als in der Kontrollgruppe, bezüglich der Milzzellen sogar signifikant. (Milz: CRP-MBP x tg4: 10% vs. C57BL/6 x tg4: 13,63%, $p=0,0195$, $n=5$ vs. 4; Leber: CRP-MBP x tg4: 6,92% vs. C57BL/6 x tg4: 8,225%, $p=0,1905$, $n=5$ vs. 4) (Abb.10 A+B). Diese Tendenz zeigte sich auch in einem Wiederholungsversuch.

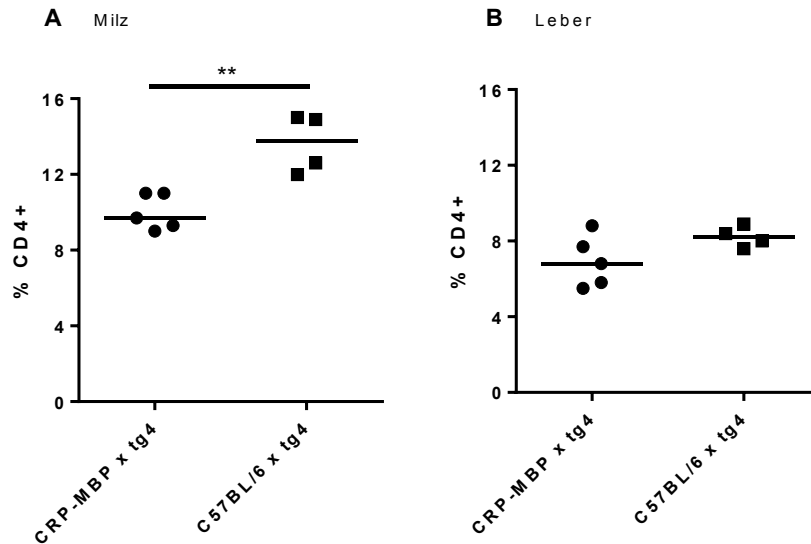


Abb.10: Anteil der CD4+ T Zellen an CD45.1+ Zellen. A: Milzzellen. B: Leberzellen. Analyse an Tag 7 nach MBP-Immunisierung der Versuchstiere.

Als nächstes sollte überprüft werden, ob die isolierten CD4+CD25- T Zellen aus Milz und Leber *ex vivo* stimulierbar sind. Hierfür wurden ebenfalls Ansätze mit Antigen-spezifischer und unspezifischer Restimulation angesetzt und die Zytokine im Zellkulturüberstand gemessen. Von Interesse war dabei besonders die Produktion der Zytokine IFN- γ und IL-17. Bezüglich der IFN- γ -Produktion waren die Milzzellen der CRP-MBP x tg4 Mäuse unspezifisch stimulierbar und ein wesentlicher Unterschied zur Kontrollgruppe konnte nicht festgestellt werden (CRP-MBP x tg4: 308,2pg/ml vs. C57BL/6 x tg4: 203,7pg/ml, $p=0,4127$, $n=5$) (Abb.11A). Nach Antigen-spezifischer Stimulation der Milzzellen lag hingegen eine signifikant niedrigere Produktion im Vergleich zu Kontrollgruppe vor (CRP-MBP x tg4: 141,1pg/ml vs. C57BL/6 x tg4: 712,7pg/ml, $p=0,0159$, $n=5$) (Abb.11B). Auch hinsichtlich der Leberzellen war eine vergleichbare Tendenz erkennbar: Nach unspezifischer Restimulation war die Zytokinproduktion vergleichbar mit der Kontrollgruppe (CRP-MBP x tg4: 2301pg/ml vs. C57BL/6 x tg4: 1951pg/ml, $p=0,8254$, $n=5$ vs. 4) (Abb.11C). Antigen-spezifische Restimulation führte zu wesentlich verminderter IFN- γ -Produktion im Vergleich zur Kontrollgruppe (CRP-MBP x tg4: 18,15pg/ml vs. C57BL/6 x tg4: 84,83pg/ml, $p=0,2667$, $n=2$ vs. 4) (Abb.11D). Ein weiterer Versuch lieferte bezüglich der Milzzellen vergleichbare Ergebnisse.

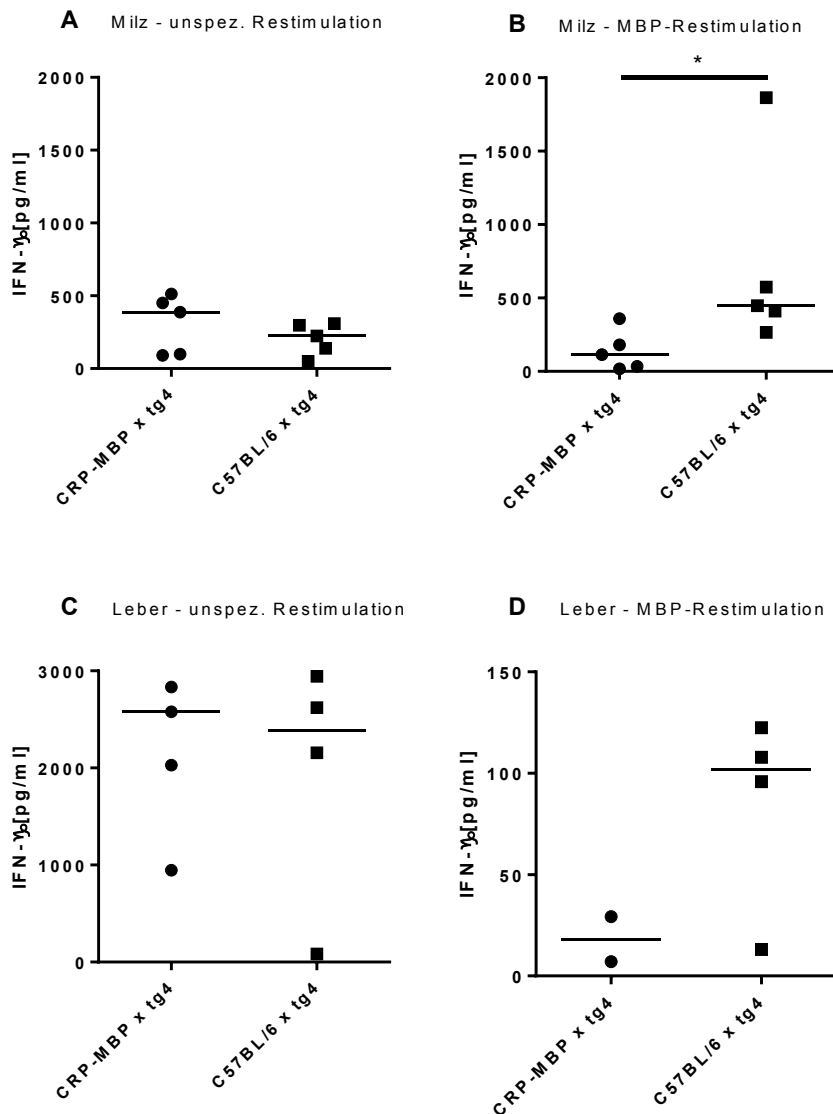


Abb.11: IFN- γ im Zellkulturüberstand nach 72h Restimulation von CD4+CD25- T Zellen (5×10^5) aus Milz (A+B) und Leber (C+D). Unspezifische Restimulation mit je $2 \mu\text{g/ml}$ anti-CD3 AK und anti-CD28 AK (A+C). Antigen-spezifische Restimulation mit 50ng/ml MBP in Anwesenheit von DC (5×10^4) (B+D). Analyse an Tag 7 nach MBP-Immunsierung der Versuchstiere.

Das Zytokin IL-17 konnte in den Messungen ebenfalls detektiert werden. Hier zeigten sich in beiden Versuchsdurchführungen nach unspezifischer Restimulation in der Milz keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe (Milz: CRP-MBP x tg4: $303,8 \text{pg/ml}$ vs. C57BL/6 x tg4: $325,5 \text{pg/ml}$, $p=0,6667$, $n=5$) (Abb.12A). Nach MBP-spezifischer Restimulation wiesen die Zellen der Mäuse mit hepatisch exprimiertem MBP tendenziell weniger Zytokinproduktion auf als die Kontrollgruppe; sowohl bezüglich der Milzzellen (CRP-MBP x

tg4: 8,05pg/ml vs. C57BL/6 x tg4: 203,3pg/ml, $p=0,1349$, $n=5$ vs. 4) (Abb.12B), als auch der Leberzellen (CRP-MBP x tg4: 41,59pg/ml vs. C57BL/6 x tg4: 87.45pg/ml, $p=0,2286$, $n=3$ vs. 4) (Abb.12C).

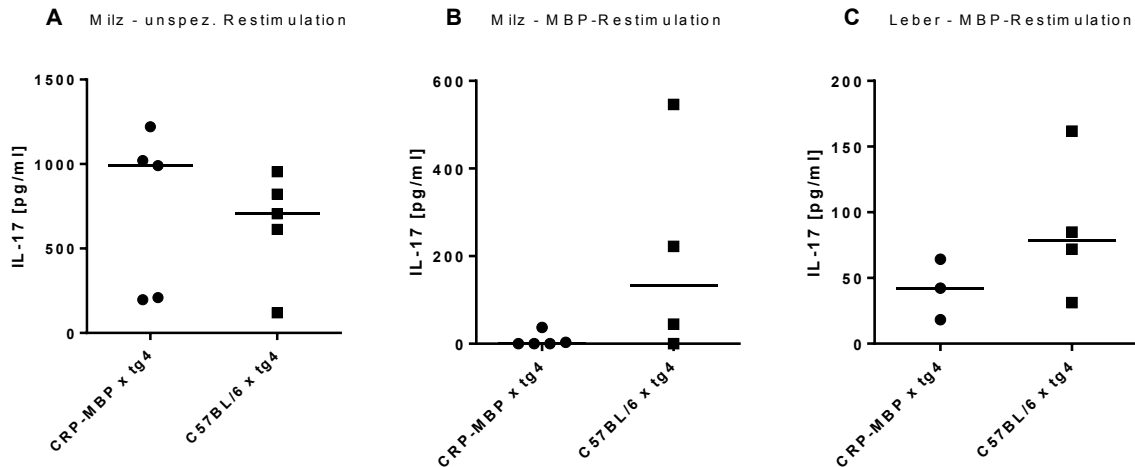


Abb.12: IL-17 im Zellkulturüberstand nach unspezifischer Restimulation von $CD4+CD25^-$ T Zellen (5×10^5) mit je $2 \mu\text{g/ml}$ anti-CD3 AK und anti-CD28 AK (A) oder Antigen-spezifischer Restimulation mit 50ng/ml MBP in Anwesenheit von DC (5×10^4) (B+C). A: nach 96h Restimulation von Milzzellen. B: nach 72h Restimulation von Milzzellen. C: nach 96h Restimulation von Leberzellen. Analyse an Tag 7 nach MBP-Immunsierung der Versuchstiere.

Bei den vorhergehenden Versuchen wurden $CD4+CD25^-$ Zellen für die Stimulation verwendet; in einem weiteren Versuch wurde eine Stimulation der Zellen in Anwesenheit von $CD25^+$ T Zellen durchgeführt. Hierbei war aber fast keine Zytokinproduktion detektierbar, was auf eine Suppression durch $CD25^+$ Treg hindeutet (keine Abbildung). Die Ergebnisse machen deutlich, dass die Zellen nach *in vivo* MBP-Immunsierung *in vitro* stimulierbar sind. Darüber hinaus ist die Tendenz erkennbar, dass die Zellen der Linie CRP-MBP x tg4 nach Antigen-spezifischer Stimulation weniger pro-inflammatorische Zytokine produzieren als die Vergleichsgruppe.

Des Weiteren wurde der Anteil der $IFN-\gamma$ - und IL-17-produzierenden $CD4^+$ T Zellen erfasst. Die Analyse in der Durchflusszytometrie ergab, dass rund 20% der hepatischen $CD4^+$ T Zellen nach unspezifischer Stimulation das Effektorzytokin $IFN-\gamma$ produzierten (CRP-MBP x tg4: 20,8% vs. C57BL/6 x tg4: 17,1%, $p=0,3730$, $n=5$ vs. 4) (Abb.13A). Es lag aber kein Unterschied zur Kontrollgruppe vor. Der Anteil der IL-17-produzierenden Leberlymphozyten lag bei rund 10% (CRP-MBP x tg4: 11,4% vs. C57BL/6 x tg4: 9,8%, $p=0,6825$, $n=5$ vs. 4) (Abb.13B). In der Milz waren diese Werte in beiden Gruppen geringer (keine Abbildung). Die Ergebnisse wurden in einem zweiten Versuch verifiziert.

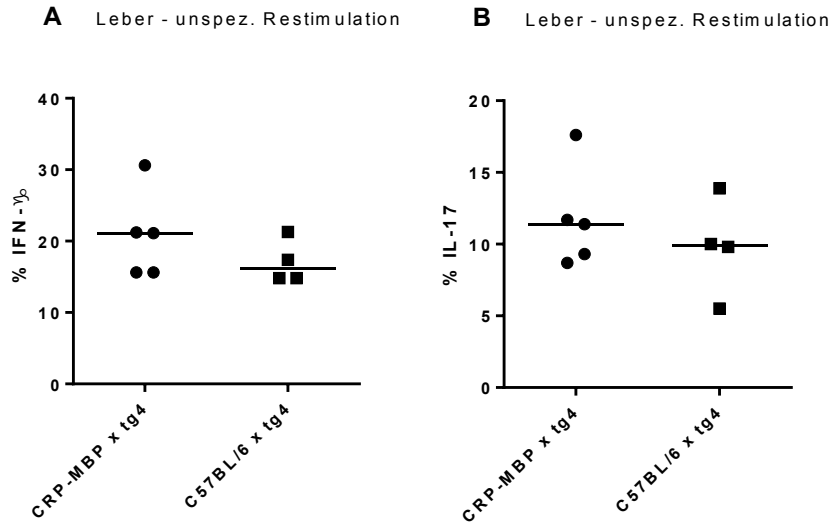


Abb.13: Anteil der IFN- γ -produzierenden T Zellen (A) und IL-17-produzierenden T Zellen (B) an CD4⁺ T Zellen in der Leber nach 4h unspezifischer Restimulation (100ng/ml PMA und 2 μ g/ml Ionomycin). Analyse an Tag 7 nach MBP-Immunisierung der Versuchstiere.

Da bekannt ist, dass regulatorische T Zellen relevant für eine Immuntoleranz sind und die CRP-MBP x tg4 Mäuse gegenüber der EAE tolerant waren, sollte überprüft werden, ob der Anteil von Treg an CD4⁺ T Zellen in diesen Mäusen nach MBP-Immunisierung erhöht ist. Auch hier wurden zur weiteren Differenzierung sowohl CD25⁺Foxp3⁺ Treg als auch Foxp3⁺ Treg erfasst. In der Leber zeigten sich signifikant höhere Treg-Frequenzen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies galt für CD25⁺Foxp3⁺ Treg (CRP-MBP x tg4: 2,58% vs. C57BL/6 x tg4: 1,75%, p=0,0238, n=5 vs 4) (Abb.14A), als auch für Foxp3⁺ Treg (CRP-MBP x tg4: 4,46% vs. C57BL/6 x tg4: 2,8%, p=0,0317, n=5 vs. 4) (Abb.14B). Vergleichbare Befunde zeigten sich in der Milz, jedoch ohne signifikanten Unterschied, sowohl in Hinblick auf CD25⁺Foxp3⁺ Treg (CRP-MBP x tg4: 3,72% vs. C57BL/6 x tg4: 2,98%, p=0,2302, n=5) (Abb.14C), als auch hinsichtlich Foxp3⁺ Treg (CRP-MBP x tg4: 7,84% vs. C57BL/6 x tg4: 5,96%, p=0,1111, n=5) (Abb.14D). Hier lag hingegen im Vergleich zu den Leberproben das Niveau des Treg-Anteils insgesamt höher. Die Ergebnisse sind für drei Versuche repräsentativ, allerdings waren die Unterschiede bezüglich der Leberproben nicht in allen Versuchen signifikant.

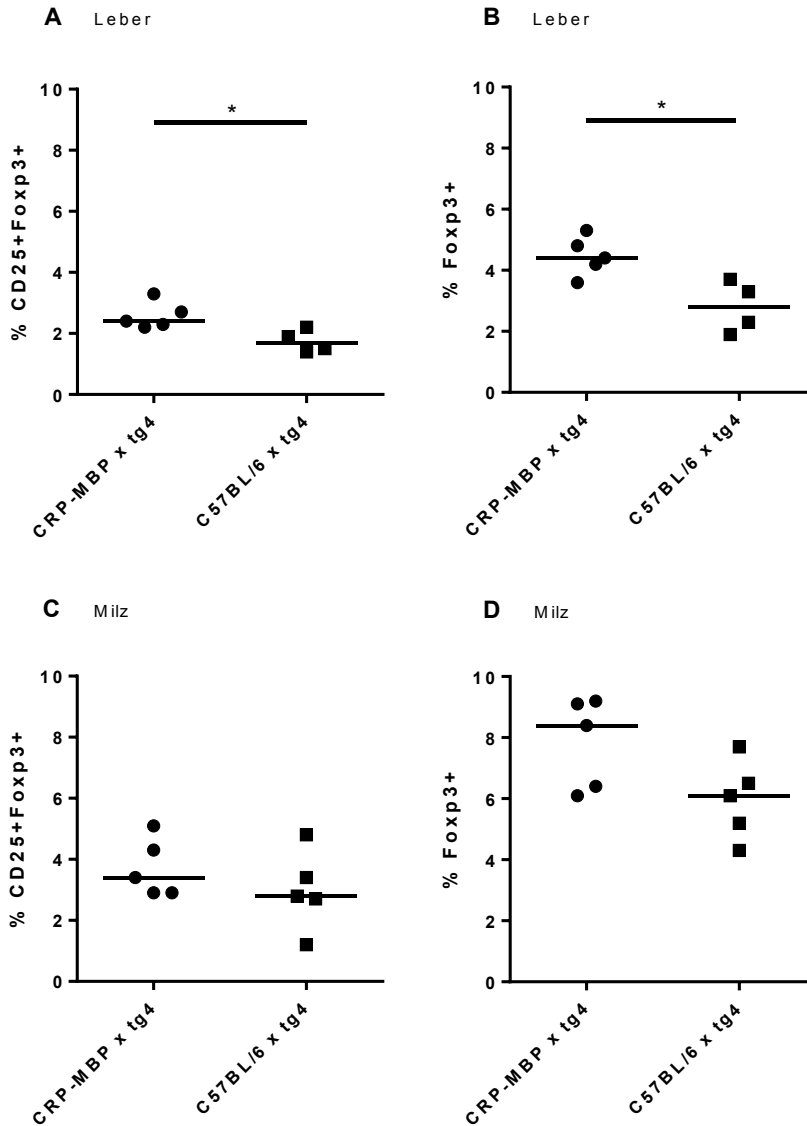


Abb.14: Anteil der CD25+Foxp3+ und Foxp3+ T Zellen an ++ T Zellen. A+B: Leberzellen. C+D: Milzzellen. Analyse an Tag 7 nach MBP-Immunisierung der Versuchstiere.

Als weitere potenziell tolerogene CD4+ T Zell-Subpopulation wurden die Frequenzen der Typ 1 regulatorischen T Zellen anhand der Oberflächenmarker CD49b und LAG-3 erfasst. Der Anteil der Tr1-Zellen an CD4+ T Zellen betrug in einem Versuch in Milz und Leber in beiden Gruppen unter 1% (keine Abbildung). In einem Wiederholungsversuch lag der Wert in beiden Gruppen knapp über 1 % (keine Abbildung). Obwohl in den CRP-MBP x tg4 Mäusen die Toleranz persistent war, lagen keine erhöhten Frequenzen der Tr1-Zellen vor.

Die Befunde der Immunisierungsversuche zeigen, dass die Mäuse der Linie CRP-MBP x tg4 nicht suszeptibel bezüglich der EAE-Induktion sind und die Toleranz der CRP-MBP x tg4

Mäuse persistent ist. In der Histologie waren nur vereinzelt entzündliche Infiltrate detektierbar. Nach *in vitro* Stimulation waren die T Zellen potentiell in der Lage eine pro-inflammatorische Effektorantwort zu generieren, wie die Zytokindetektion mittels ELISA und Durchflusszytometrie deutlich machen. Dabei führt eine Antigen-spezifische Stimulation zu verminderter Zytokinproduktion. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass leicht erhöhte Foxp3+ Treg-Frequenzen vorliegen, die Population der CD49b+LAG-3+ Tr1 Zellen jedoch nicht erhöht ist. Um zu bestätigen, dass Treg Zellen für die anhaltende Toleranz verantwortlich sind, sollte in einem nächsten Schritt zusätzlich zur MBP-Immunsierung eine Treg-Depletion *in vivo* durchgeführt werden.

4.1.3. Rolle von Treg für die hepatische MBP-Toleranz

4.1.3.1. Analyse nach MBP-Immunsierung und *in vivo* Treg-Depletion

Da Treg wichtige immunregulatorische Funktionen übernehmen, kann es bei einem Fehlen dieser Zellen zu gestörter Immunhomöostase kommen. Aus diesem Grund sollten in einem Versuch Treg *in vivo* depletiert werden, um die Auswirkungen der fehlenden Treg auf die Immunregulation zu untersuchen. Von besonderem Interesse war dabei, ob die Toleranz bezüglich EAE und Leberentzündung in den Versuchstieren trotz Defizit der Treg weiterhin persistiert. Zur Treg-Depletion wurde der anti-CD25 AK PC-61 verwendet. Dieser Antikörper ist selektiv gegen CD25 gerichtet, der alpha-Kette des IL-2-Rezeptors.

Zur Induktion der EAE wurden die Versuchstiere der Linie CRP-MBP x tg4 zunächst mit MBP immunisiert. Ab Tag 2 wurde den Mäusen zweimal wöchentlich der anti-CD25 AK (500µg in 200µl PBS gelöst) i.p. injiziert, um die Treg Zellen *in vivo* zu depletieren. Für die Erhebung des EAE-Status wurden ab Tag 7 die klinischen EAE-Symptome anhand des EAE-Scores bis Tag 30 erhoben. Um den Status der Leberentzündung zu analysieren, wurden die Serum-Transaminasen (ALT) gemessen, die Entzündungsinfiltrate in der Leber überprüft und die relative Anzahl der Leberlymphozyten erfasst. Es zeigte sich, dass die Versuchstiere trotz Treg-Depletion keine EAE-Symptome aufwiesen. In der Histologie waren moderate periportale Entzündungsinfiltrate sichtbar, bei einzelnen Tieren auch vermehrt. Die Serum-Transaminasen waren nicht erhöht und die Leberlymphozyten lagen bei rund 3 Millionen pro Gramm Leber (keine Abbildung). In einem Wiederholungsversuch konnte die Persistenz der Toleranz bestätigt werden. Allerdings zeigte die Kontrollgruppe in diesem Versuch inhomogene Krankheitsverläufe, sodass für eine einwandfreie Verifizierung eine weitere Wiederholung

nötig ist. Die Ergebnisse machen jedoch deutlich, dass die Tiere selbst nach Treg-Depletion weder für die EAE, noch für eine Leberentzündung suszeptibel waren. Die Toleranz war demnach trotz Depletion der Treg persistent.

In der Analyse mittels Durchflusszytometrie zeigte sich, dass nahezu alle CD4+CD25+ T Zellen eliminiert worden waren und die anti-CD25 AK-Behandlung somit effektiv war (Abb.15). Allerdings existierte weiterhin eine Population von CD4+CD25-Foxp3+ T Zellen. Da Foxp3 als hinreichender Marker für murine Treg gilt, sollte überprüft werden, ob die verbliebene Foxp3+ T Zellpopulation weiterhin suppressive Kapazität hat und die Treg-Depletion mittels PC-61 eventuell unvollständig war.

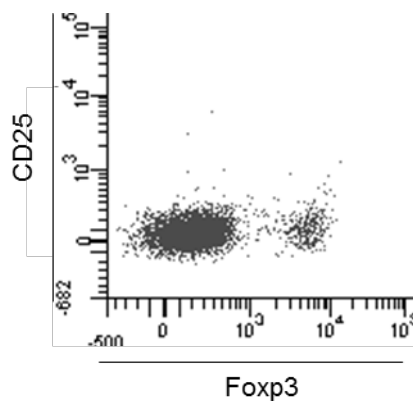


Abb.15: Population der CD25- Foxp3+ T Zellen von CRP-MBP x tg4 Mäusen nach PC-61 Behandlung (anti-CD25 AK). Analyse an Tag 30 nach MBP-Immunisierung der Versuchstiere.

4.1.3.2. *In vitro* Treg-Suppressionsassay

In diesem Versuch galt es zu überprüfen, ob die Treg-Depletion mittels anti-CD25 AK tatsächlich effektiv ist und die verbliebenen CD25-Foxp3+ Treg Zellen durch die PC-61 Behandlung ihre supprimierende Funktion verlieren. Um dies zu überprüfen, sollten Versuchstiere mit PC-61 AK behandelt werden, anschließend die Foxp3+ Zellen isoliert und ihre verbliebene suppressive Kapazität im Suppressionsassay erfasst werden. Mäuse der Linie foxp3gfp exprimieren unter dem Promoter des Foxp3 Gens das green fluorescent protein (gfp). Gfp dient dabei als Reportersignal anhand dessen man mittels Durchflusszytometrie die Zellen sortieren kann. Zunächst wurden Versuchstiere der Linie B6.SJL/BoyJ x foxp3gfp mit PC-61 AK behandelt (500µg in 200µl PBS gelöst). Nach zwei Tagen wurden die Lymphozyten aus der Milz isoliert und die Foxp3+ Zellen anschließend per Durchflusszytometrie anhand des gfp sortiert. Hiernach wurde eine Kokultur aus unspezifisch stimulierten fluoreszenz-markierten (CellTrace™ CFSE) CD4+CD25- Responder T Zellen (Tresp) (1×10^6) und CD3- Antigen-

präsentierenden Zellen (4×10^6) angesetzt. Die isolierten Foxp3+ Zellen wurden in absteigender Zellzahl (1×10^6 , 5×10^5 , 25×10^4 , $12,5 \times 10^3$, 0) zu den Tresp hinzugefügt (Verhältnis Tresp:Treg 1:1, 2:1, 4:1, 8:1, 1:0, 2:0). Die suppressive Kapazität wurde mit Hilfe eines Proliferationstests überprüft. Es zeigte sich, dass die stimulierten Tresp sich trotz Anwesenheit der Foxp3+ Treg teilten. Das absteigende Verhältnis hatte dabei keinen Einfluss auf die Proliferation der Tresp. Selbst bei hoher Treg Konzentration (Verhältnis Tresp: Treg 1:1) war nur eine sehr geringe Suppression sichtbar (Abb.16B). Dies wird auch im Histogramm der Tresp Zellen evident: es sind mehrere Gipfel mit abnehmender Fluoreszenz zu erkennen (Abb.16A). Da die Farbintensität pro Teilung um die Hälfte abnimmt, ist davon auszugehen, dass Zellteilungen der Tresp stattgefunden haben und sie somit nicht supprimiert wurden. Bei komplett supprimierten Zellen wäre nur ein einzelner Peak mit hoher Intensität vorhanden. Somit ist evident, dass die Foxp3+CD25- Treg über keine relevante Suppressionskapazität nach Behandlung mit PC-61 verfügen und folglich die Treg-Depletion effektiv ist. Das Ergebnis sollte jedoch durch Wiederholung bestätigt werden.

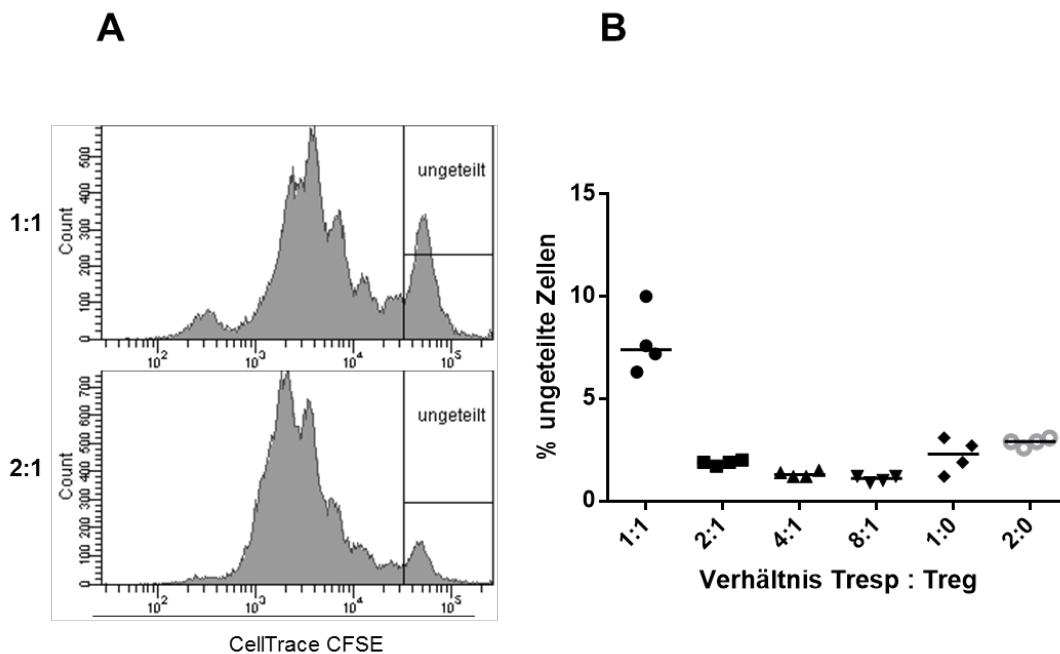


Abb.16: Proliferation von CD4+CD25- Responder T Zellen (10^6) bei Kokultur mit Foxp3+ Treg und CD3- Antigen-präsentierenden Zellen (4×10^6). A: CFSE-Verdünnung bei Zellteilung. B: Anteil ungeteilter CD4+CD25- Responder T Zellen (Gate „ungeteilt“ aus A). Analyse an Tag 2 nach PC-61 Behandlung der Versuchstiere.

4.1.2. Rolle des Zytokins TGF- β und peripher induzierter Treg für die hepatische MBP-Toleranz

4.1.2.1. MBP-Immunsierung von TGF- β -insensitiven Mäusen (CRP-MBP x hCD2- $\Delta\kappa$ T β R II x tg4)

Es sollte detaillierter analysiert werden, inwiefern peripher induzierte Treg (iTreg) für die Toleranz der CRP-MBP x tg4 Mäuse relevant sind. Aus Vorarbeiten war bekannt, dass MBP-spezifische CD4+CD25+Foxp3+ Treg nach adoptivem Transfer in nicht-transgene Mäuse vor Ausbruch der EAE schützen konnten. Diese Treg wurden in der Peripherie TGF- β -abhängig aus konventionellen non-Treg generiert (Lüth et al. 2008). TGF- β ist für die Differenzierung von iTreg essenziell. Für die Analyse wurden Mäuse verwendet, deren T Zellen insensitive für TGF- β sind (dominant negativer TGF- β Rezeptor II, hCD2- $\Delta\kappa$ T β R II). In den Mäusen sind daher zwar die im Thymus generierten natürlichen Treg vorhanden. Da der TGF- β -Signalweg gehemmt ist, können jedoch iTreg in der Peripherie nur sehr eingeschränkt aus naiven T Zellen generiert werden. Die Versuchstiere verfügen darüber hinaus über das hepatisch exprimierte MBP, sowie den MBP-spezifischen T Zell Rezeptor (CRP-MBP x hCD2- $\Delta\kappa$ T β R II x tg4). Um zu untersuchen, ob die Mäuse trotz defizitärer Induktion von iTreg weiterhin tolerant in Bezug auf EAE und Leberentzündung sind, wurden sie mit MBP-Peptid immunisiert. Anschließend wurde der EAE-Score bis Tag 30 erhoben und die hepatischen Entzündungsparameter erfasst. Es zeigte sich, dass die Mäuse keine EAE-Symptome aufwiesen (keine Abbildung). In der Histologie waren lediglich moderate Entzündungsinfiltrate in der Leber detektierbar und die Serum-Transaminasen wiesen auf keine Leberschädigung hin (keine Abbildung). Da die Toleranz trotz defizitärer iTreg-Induktion persistent war, scheint diese Population nicht allein verantwortlich für die Toleranzkontinuität zu sein. Allerdings müssen die Ergebnisse durch Wiederholungsversuche verifiziert werden.

4.1.3. Rolle des Zytokins IL-10 für die hepatische MBP-Toleranz

4.1.3.1. Analyse nach Immunsierung von IL-10-insensitiven Mäusen (CRP-MBP x cd4-DN-IL10R x tg4)

Da das Zytokin IL-10 anti-inflammatorisch wirkt und darüber hinaus als Leitzytokin der potenziell tolerogenen Tr1 Zellen gilt, sollte überprüft werden, ob in Mäusen, deren T Zellen insensitive für IL-10 sind, eine EAE oder Leberentzündung generiert werden kann. Zu diesem

Zweck wurden Mäuse der Linie CRP-MBP x *cd4*-DN-IL10R x tg4 mit MBP immunisiert und ab Tag 7 der EAE-Score anhand der klinischen Symptome bis Tag 30 dokumentiert. Bezüglich der EAE-Induktion zeigte sich, dass die Versuchstiere keine EAE-Symptome aufwiesen. In der Histologie waren nur vereinzelt Infiltrate detektierbar (keine Abbildung). Die Serum-Transaminasen deuteten auf keine Schädigung des Lebergewebes hin (keine Abbildung). Die Befunde zeigen, dass die Tiere trotz IL-10-Insensitivität und MBP-Spezifität der T Zellen tolerant gegenüber der EAE-Induktion waren und keine Leberentzündung generiert werden konnte.

4.1.3.2. Analyse von CRP-MBP x tg4 Mäusen nach Immunisierung und Behandlung mit IL-10-Rezeptor Antikörper

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses von IL-10 auf die hepatische Toleranz sollte überprüft werden, wie sich eine Blockade des IL-10-Rezeptors mit einem hemmenden Antikörper auf die Toleranzpersistenz auswirkt. Mäuse der Linie CRP-MBP x B10.PL wurden zunächst mit IL-10-Rezeptor AK behandelt (0,15ng anti-CD210 AK in 150µl gelöst) und 72h später mit MBP-Peptid immunisiert. Die Reinjektion des IL-10-Rezeptor AK erfolgte einmal wöchentlich. Ab Tag 7 wurde der EAE-Score bis Tag 30 anhand der klinischen Symptome erhoben. Die Versuchstiere zeigten keine EAE-Symptome. In der Histologie waren nur vereinzelt entzündliche Infiltrate erkennbar (keine Abbildung). Auch die Serum-Transaminasen wiesen auf keine Leberschädigung hin (keine Abbildung). Die Befunde zeigen, dass trotz Blockade des IL-10-Rezeptors keine EAE oder Leberentzündung generiert werden konnte.

4.2. Charakterisierung des Phänotyps MBP-spezifischer T Zellen (tg4) nach Transfer in CRP-MBP Mäuse

4.2.1. Analyse nach MBP-Immunisierung und adoptivem T Zell-Transfer

In der vorliegenden Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass T Zellen der Linie CRP-MBP x tg4 MBP-spezifisch sind und sich *in vitro* stimulieren lassen. *In vivo* konnten diese Zellen nach Stimulation aber offensichtlich weder eine EAE noch eine Leberentzündung generieren. Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, dass die endogenen tg4 T Zellen durch das hepatisch exprimierte MBP Toleranz erwerben. Um dies auszuschließen, wurden nicht-

tolerante MBP-spezifische T Zellen aus Mäusen ohne hepatisch exprimiertes MBP (tg4) in Mäuse transferiert, die über das hepatische MBP verfügten (CRP-MBP x B10.PL). Pro Empfängertier erfolgte der intravenöse Transfer von $5-10 \times 10^6$ Zellen in $150 \mu\text{l}$ PBS. Als Kontrollgruppe dienten Empfängertiere der Linie B6.SJL/BoyJ x B10.PL. Die Empfängertiere wurden zusätzlich 24h vor Transfer mit MBP immunisiert, um einen entzündlichen Kontext zu gewährleisten. Es galt nun zu prüfen, ob die transferierten Zellen weiterhin nicht-tolerant und letztlich pro-inflammatorisch waren oder ob sie durch das hepatisch exprimierte MBP der Empfängertiere beeinflusst wurden und Toleranz erwarben. Die Analyse erfolgte an Tag 7 nach Transfer (Abb.1), bei der zum einen die hepatischen Entzündungsparameter in den Empfängertieren erfasst wurden. Zum anderen war die Entwicklung der transferierten vormals nicht-toleranten Spenderzellen von besonderem Interesse. Sie wurden anhand des kongenen Markers CD45 mittels Durchflusszytometrie identifiziert: die Zellen der Empfängertiere waren CD45.1 und CD45.2 positiv, die der Spender hingegen nur CD45.2 positiv (Abb.17). CD45.1 und CD45.2 stellen zwei unterschiedliche Allele von CD45 dar, sind funktional jedoch identisch.

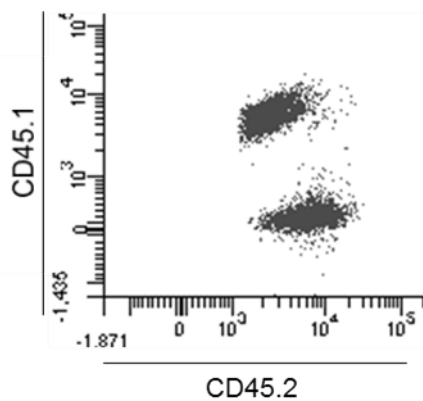
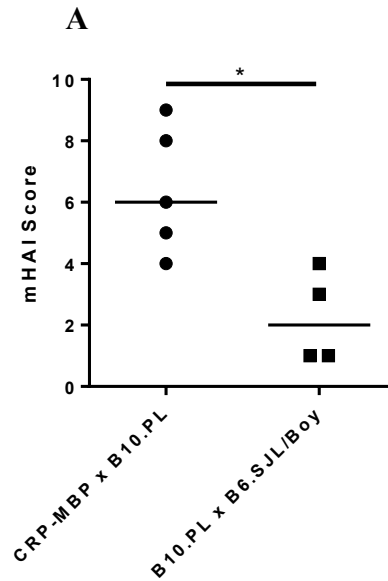
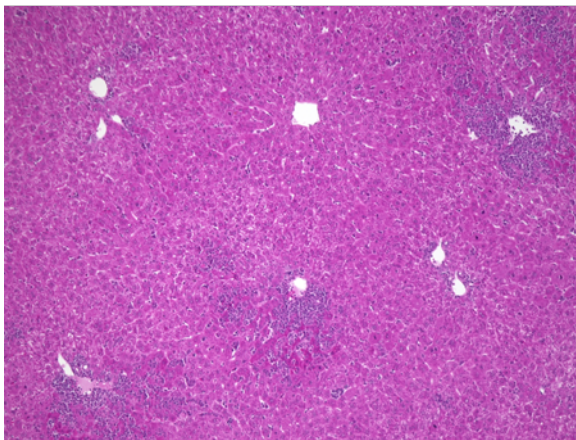


Abb.17: Population der CD45.1+CD45.2+ T Zellen der Empfängertiere und CD45.2+ T Zellen der Spendertiere nach adoptivem T Zell-Transfer. Analyse an Tag 7 nach MBP-Immunisierung der Empfängertiere (Tag 0) und Zelltransfer (Tag 1).

Histologisch wurde die Leberentzündung von einem Pathologen ausgewertet. Dabei zeigte sich bei den Empfängertieren mit hepatisch exprimiertem MBP im Vergleich zur Kontrollgruppe eine stärkere Entzündung, die nach dem mHAI-Score signifikant war (CRP-MBP x B10.PL: 6 vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL: 2, $p=0,0268$, $n=5$ vs. 4). Dies ist für drei Versuche repräsentativ (Abb.18).



B
CRP-MBP x B10.PL



C
B10.PL x B6.SJL/BoyJ

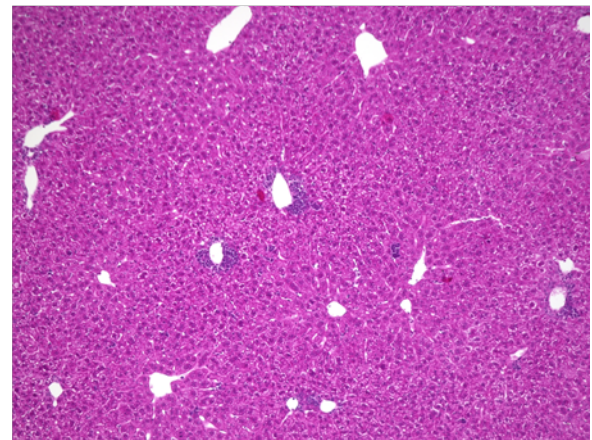


Abb.18: A: Histologische Bewertung der Leberentzündung anhand des histologischen mHAI-Scores. B+C: HE-Färbung der Leber (Vergrößerung= $\times 10$; $n=5$). B: CRP-MBP x B10.PL Mäuse. C: B6.SJL/BoyJ x B10.PL Mäuse. Analyse an Tag 7 nach MBP-Immunisierung der Empfängertiere (Tag 0) und Zelltransfer (Tag 1).

Die relative Zellzahl der Leberlymphozyten war mit ca. 13×10^6 Leberlymphozyten pro Gramm Leber in allen Versuchen deutlich erhöht. Jedoch waren im Gegensatz zur Histologie keine Unterschiede zur Kontrollgruppe erkennbar (CRP-MBP x B10.PL: $13,36 \times 10^6$ vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL: $11,39 \times 10^6$, $p=0,6825$, $n=5$ vs. 4) (Abb.19A). In einem dritten Versuch lagen die Werte bei über 20×10^6 Zellen, sodass eine weitere Versuchswiederholung nötig scheint, um das Ergebnis zu verifizieren. In den absoluten Zellzahlen der CD4+ T Zellen war jedoch wieder ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe erkennbar (CRP-MBP x B10.PL: $1,836 \times 10^6$ vs.

B6.SJL/BoyJ x B10.PL: $0,989 \times 10^6$, $p=0,0159$, $n= 5$ vs. 4) (Abb.19B). Allerdings lagen die Zahlen der verschiedenen Versuchswiederholungen mit Werten zwischen $1,8 \times 10^6$ und $6,9 \times 10^6$ CD4+ T Zellen auf unterschiedlichen Niveaus. Die Transaminasenmessungen ergaben moderat erhöhte Werte in der Gruppe der CRP-MBP x B10.PL Mäuse (CRP-MBP x B10.PL: 92 U/l vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL: 25 U/l, $p=0,0635$, $n=5$ vs. 4) (Abb.19C). Dies wurde in einem Wiederholungsversuch bestätigt.

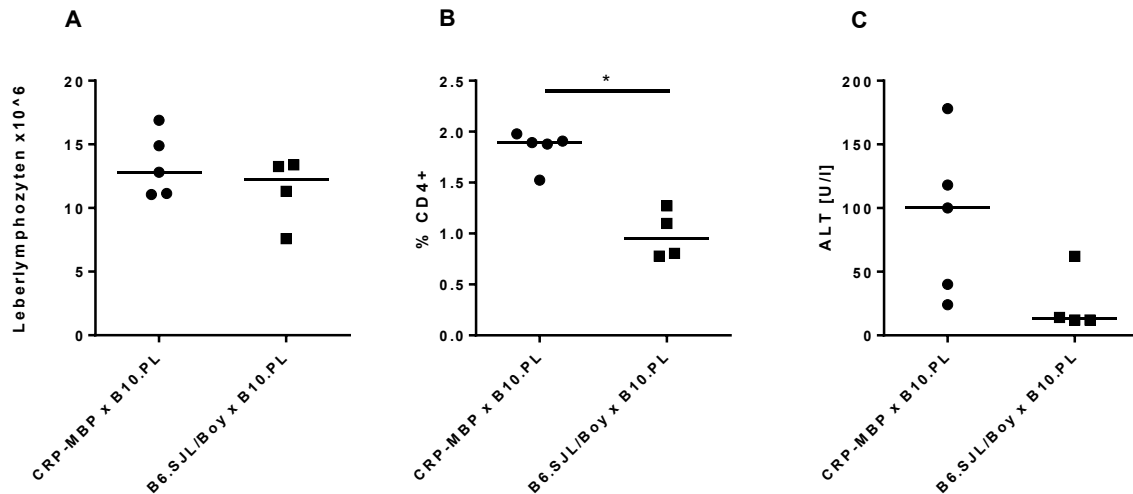


Abb.19: A: Anzahl der Leberlymphozyten. B: Anteil der CD4+ T Zellen an lebenden Gesamtzellen aus der Leber. C: Messwert des Enzyms Alanin-Aminotransferase (ALT) im Blutserum. Analyse an Tag 7 nach MBP-Immunisierung der Empfängertiere (Tag 0) und Zelltransfer (Tag 1).

Die transferierten T Zellen waren anhand des Oberflächenmarkers CD45 eindeutig zu identifizieren (Abb.17) und es wurde zunächst der Anteil der transferierten Zellen an der Gesamtpopulation der CD4+ T Zellen analysiert. Dieser Anteil lag in allen drei Versuchen in der Leber über dem Anteil der endogenen CD4+ T Zellen, in der Milz hingegen darunter. Zudem waren die Werte in den CRP-MBP x B10.PL Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (Milz: CRP-MBP x B10.PL: 37,18% vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL: 29,25%, $p=0,3968$, $n=5$ vs. 4; Leber: CRP-MBP x B10.PL: 72,8% vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL: 46,98%, $p=0,0635$, $n=5$ vs. 4) (Abb.20). Die Werte schwankten jedoch zwischen den Versuchen, sodass eine Wiederholung nötig ist.

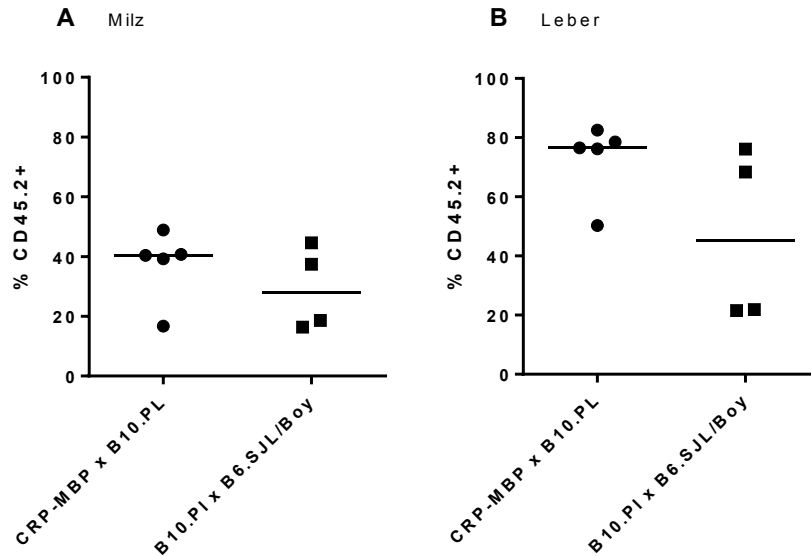


Abb.20: Anteil der CD45.2+ T Zellen der Spendertiere (tg4) an den Gesamtzellen. A: Milzzellen. B: Leberzellen. Analyse an Tag 7 nach MBP-Immunsierung der Empfängertiere (Tag 0) und Zelltransfer (Tag 1).

Um zu überprüfen, ob die transferierten Zellen fähig waren pro-inflammatorische Zytokine zu produzieren, wurden die Proben aus Milz und Leber *in vitro* unspezifisch mit PMA/Ionomycin stimuliert und der Anteil der Zytokin-produzierenden Spenderzellen am Gesamtanteil der CD4+ Spenderzellen erfasst. Es zeigte sich, dass die IFN- γ -produzierende Population im Vergleich zur Kontrollgruppe größer war. Jedoch waren die Messniveaus der drei wiederholten Versuche recht unterschiedlich und nur in einem Versuch lag der Anteil der IFN- γ -produzierenden T Zellen signifikant über dem der Kontrollgruppe (Milz: CRP-MBP x B10.PL: 71,32% vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL: 34,35%, $p=0,0159$, $n=5$ vs. 4; Leber: CRP-MBP x B10.PL: 89% vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL: 62,25%, $p=0,0159$, $n=5$ vs. 4) (Abb.21 A+B). Nach Antigen-spezifischer Restimulation war die Population in der Leber nahezu verdoppelt im Vergleich zur Kontrollgruppe, dies allerdings auf niedrigem Niveau (CRP-MBP x B10.PL: 7,04% vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL: 3,75%, $p=0,1111$, $n=5$ vs. 4) (Abb.21C). Tendenziell zeigen die Messungen, dass die Werte in den CRP-MBP Mäusen höher lagen; zur weiteren Überprüfung ist aber eine erneute Wiederholung sinnvoll.

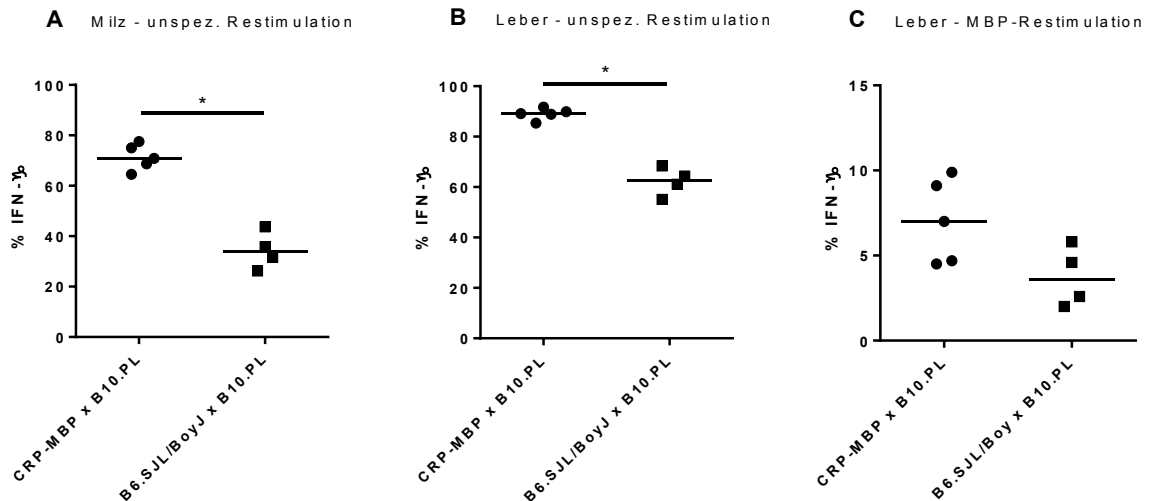


Abb.21: Anteil der IFN- γ -produzierenden Zellen an CD4+ T Zellen der Spendertiere (tg4) nach 6h unspezifischer Restimulation mit PMA (100ng/ml) und Ionomycin (2 μ g/ml) (A+B) oder Antigen-spezifischer Restimulation mit MBP (100ng/ml) (C). A: Milzzellen. B+C: Leberzellen. Analyse an Tag 7 nach MBP-Immunsierung der Empfängertiere (Tag 0) und Zelltransfer (Tag 1).

Der Anteil der IL-17-produzierenden Zellen an der Gesamtpopulation der transferierten Zellen lag bei zwei Versuchen nach unspezifischer Restimulation bei knapp 6%. Hinsichtlich der Milz bzw. Leber und bezüglich der Kontrollgruppen waren jedoch keine Unterschiede feststellbar (Milz: CRP-MBP x B10.PL: 5,7% vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL: 5,83%, $p=0,9127$, $n=5$ vs. 4; Leber: CRP-MBP x B10.PL: 5,38% vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL: 8,05%, $p=0,5556$, $n=5$ vs. 4) (Abb.22 A+B). Die Ergebnisse sind für zwei Versuche repräsentativ.

Nach Antigen-spezifischer Restimulation war der IL-17-produzierende Anteil der transferierten Zellen in den CRP-MBP x B10.PL Empfängertieren signifikant niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe, jedoch auf niedrigem Niveau. Dies galt für die Milzzellen (CRP-MBP x B10.PL: 0,26% vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL: 2,88%, $p=0,0195$, $n=5$ vs. 4) (Abb.22C), als auch für die Leberzellen (CRP-MBP x B10.PL: 0,02% vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL: 1,5%, $p=0,0151$, $n=5$ vs. 4) (Abb.23D). Allerdings konnte die Antigen-spezifische Restimulation nur bei einem Versuch durchgeführt werden, sodass eine Wiederholung nötig ist.

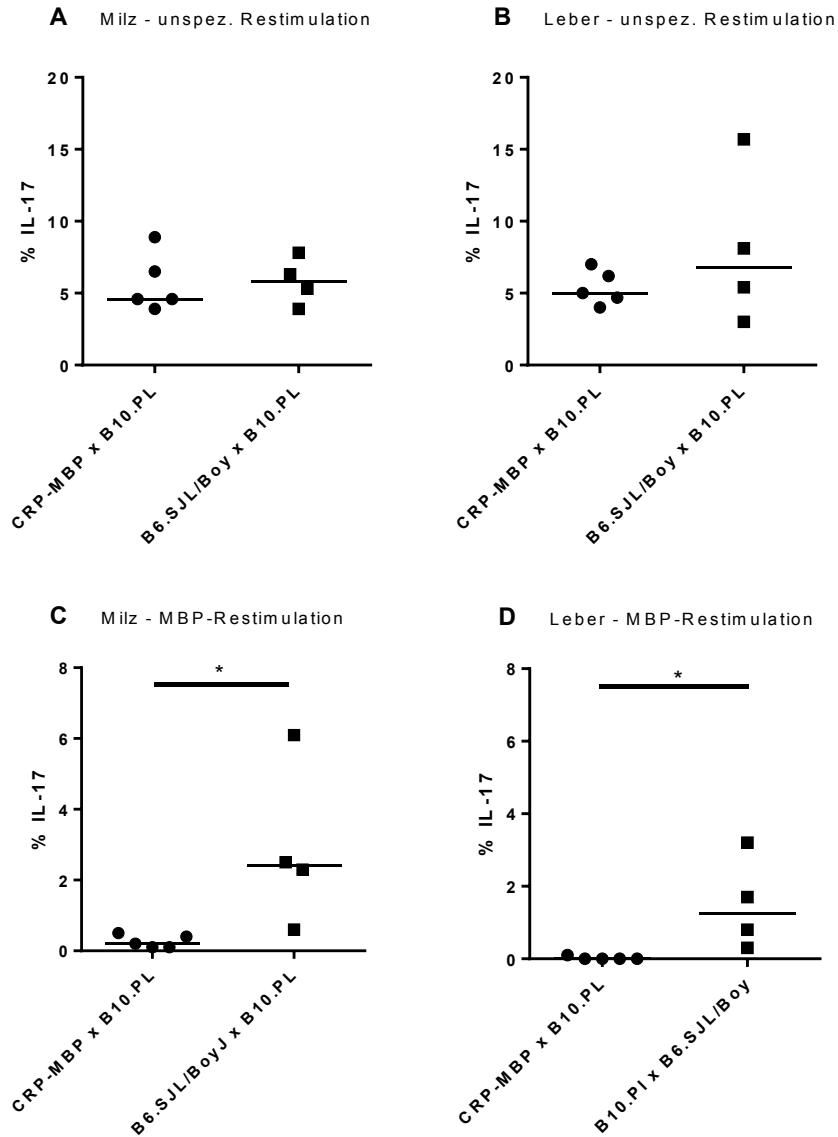


Abb.22: Anteil der IL-17-produzierenden Zellen an CD4⁺ T Zellen der Spendertiere (tg4) nach 6h unspezifischer Restimulation mit PMA (100ng/ml) und Ionomycin (2µg/ml) (A+B) oder Antigen-spezifischer Restimulation mit MBP (100ng/ml) (C+D). A+C: Milzzellen. B+D: Leberzellen. Analyse an Tag 7 nach MBP-Immunsierung der Empfängertiere (Tag 0) und Zelltransfer (Tag 1).

Auch im Zellkulturüberstand waren IFN- γ und IL-17 nach unspezifischer und Antigen-spezifischer Restimulation messbar. Hier zeigten sich jedoch keine signifikanten Gruppenunterschiede (keine Abbildung).

In einem weiteren Versuch wurde der Transfer wie bereits beschrieben durchgeführt, die Analyse fand jedoch an Tag 15 statt. Die Leberhistologie wurde nach dem mHAI-Score ausgewertet. Dabei war die Leberentzündung deutlich geringer als bei Analyse an Tag 7 und es konnte kein signifikanter Gruppenunterschied festgestellt werden (CRP-MBP x B10.PL: 2 vs.

B6.SJL/BoyJ x B10.PL: 1, $p=0,2320$, $n=5$) (keine Abbildung). Die Leberlymphozyten waren im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant erhöht, jedoch mit rund 10×10^6 Zellen sehr zahlreich (CRP-MBP x B10.PL: $10,96 \times 10^6$ vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL: $12,82 \times 10^6$, $p=0,5317$, $n=5$) (keine Abbildung). Die Transaminasen lagen hier im Normalbereich. Die transferierten Zellen waren weitestgehend nicht mehr auffindbar. Außerdem zeigten die Versuchstiere bis Tag 15 keine EAE-Symptome (keine Abbildung). Die Befunde machen deutlich, dass das entzündliche Geschehen in der Leber von Tag 7 zu Tag 15 abnimmt und die Toleranz bezüglich der EAE weiterhin persistent ist. Allerdings sollten die Ergebnisse durch Wiederholung bestätigt werden.

Um zu überprüfen, ob die transferierten vormals nicht-toleranten T Zellen einen toleranten Phänotyp angenommen haben, wurde der Anteil von Foxp3+ Treg an der Gesamtpopulation der Transferzellen bemessen. Dieser lag bei unter 1% und war signifikant niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe (keine Abbildung). Die gleiche Tendenz wurde in Bezug auf CD25+Foxp3+ Treg deutlich, jedoch ohne signifikante Unterschiede (keine Abbildung).

Ebenso wurde der Anteil von CD49b+LAG-3+ Tr1 Zellen an der transferierten CD4+Foxp3-Spenderzellpopulation erfasst. Interessanterweise war der Anteil im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Dies wird insbesondere bei den Proben aus der Leber deutlich: Hier zeigten rund 30% der transferierten CD4+ T Zellen den Tr1-Phänotyp. (Milz: CRP-MBP x B10.PL: 19,5% vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL: 4,9%, $p=0,0286$, $n=4$; Leber: CRP-MBP x B10.PL: 31,6% vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL: 8,53%, $p=0,0159$, $n=5$ vs. 4) (Abb.23). Die Ergebnisse wurden durch einen zweiten Versuch bestätigt. In einem weiteren Versuch zeichnete sich eine ähnliche Tendenz ab; die Unterschiede zur Kontrollgruppe waren aber wesentlich geringer.

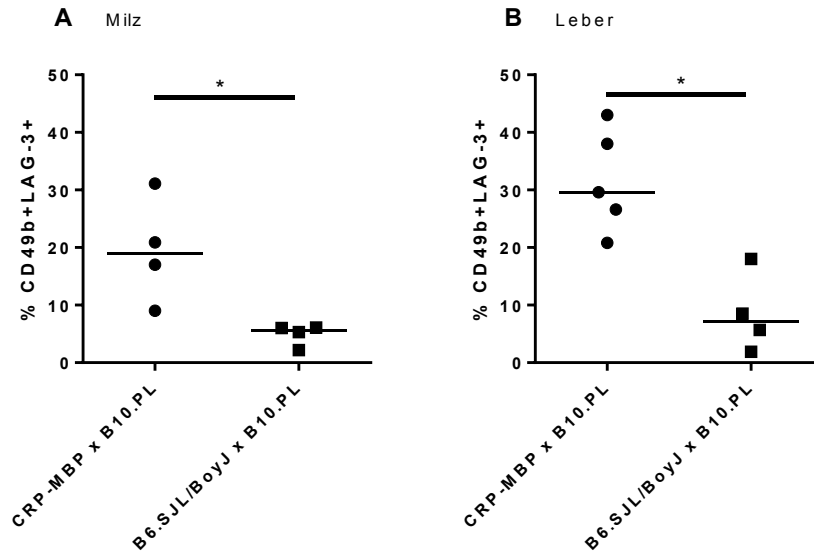


Abb.23: Anteil der CD49b+LAG-3+ T Zellen an CD4+ T Zellen der Spendertiere (tg4). A: Milzzellen. B: Leberzellen. Analyse an Tag 7 nach MBP-Immunisierung der Empfängertiere (Tag 0) und Zelltransfer (Tag 1).

Da IL-10 als das Leitzytokin von Tr1 Zellen gilt, wurde eine IL-10-Bestimmung im Zellkulturüberstand durchgeführt. Hier zeigte sich nach 72h MBP-spezifischer Restimulation in drei Versuchen eine höhere IL-10-Produktion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Unterschiede waren jedoch nur in einem Versuch signifikant (Milz: CRP-MBP x B10.PL: 378pg/ml vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL: 104pg/ml, $p=0,0159$, $n=5$ vs 4; Leber: CRP-MBP x B10.PL: 303pg/ml vs. B6.SJL/BoyJ x B10.PL: 87pg/ml, $p=0,0159$, $n=5$ vs. 4) (Abb.24).

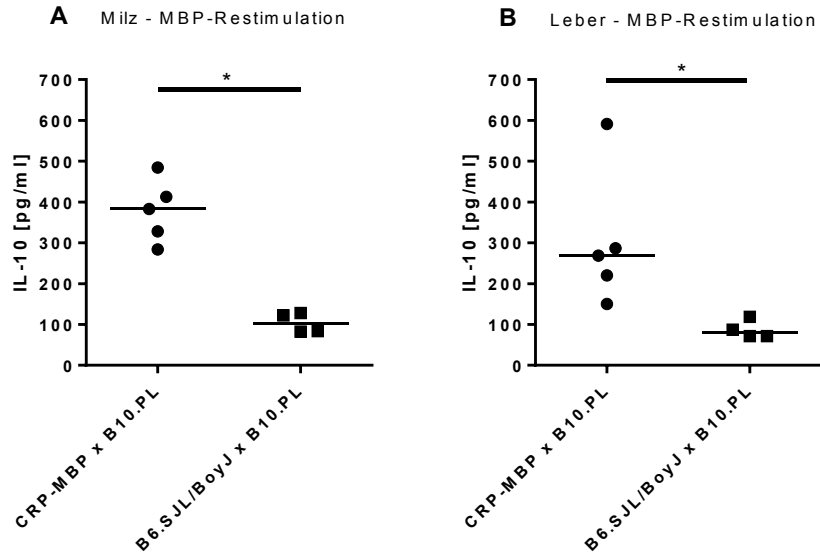


Abb.24: IL-10 im Zellkulturüberstand nach 72h MBP-spezifischer Restimulation (50ng/ml MBP) in Anwesenheit von 5×10^4 DC. A: Milzzellen. B: Leberzellen. Analyse an Tag 7 nach MBP-Immunisierung der Empfängertiere (Tag 0) und Zelltransfer (Tag 1).

Die Ergebnisse zeigen, dass nach MBP-Immunisierung und adoptivem T Zelltransfer ein transientes entzündliches Geschehen in der Leber generiert werden kann. Die transferierten Zellen waren stimulierbar und konnten pro-inflammatorische Zytokine produzieren. Besonders auffällig ist der große Anteil an transferierten Zellen mit Tr1-Phänotyp. Im nächsten Schritt sollte daher untersucht werden, inwiefern Tr1 Zellen für die Aufrechterhaltung der Toleranz relevant sind und ob sie über suppressive Kapazität verfügen.

4.2.2. *In vitro* Suppressionsassay transferierter Zellen mit Tr1-Phänotyp

In diesem Versuch galt es zu prüfen, ob die transferierten Zellen mit Tr1-Phänotyp über suppressive Kapazität verfügen. Zu diesem Zweck wurden wie oben beschrieben $CD4^+$ T Zellen der Linie *foxp3gfp x tg4* aus der Milz isoliert und in Empfängertiere der Linie CRP-MBP x B10.PL transferiert. Die Empfängertiere wurden 24h zuvor mit MBP-Peptid immunisiert (Tag 0). Anschließend wurden an Tag 7 nach Transfer die Lebern der Empfängertiere isoliert und anhand *foxp3gfp*, sowie der Oberflächenmarker CD49b und LAG-3 mittels Durchflusszytometrie die transferierten $Foxp3-CD49b+LAG-3+$ Zellen isoliert (Abb.25) Im Anschluss wurde eine Kokultur aus unspezifisch stimulierten und fluoreszenzmarkierten (CFSE) $CD4^+CD25^-$ Responder T Zellen (Tresp) und $CD3^-$ Antigen-präsentierenden Zellen (APC) angesetzt. Die isolierten Zellen mit Tr1-Phänotyp wurden in absteigender Zellzahl

(1×10^6 , 5×10^5 , 25×10^4 , $12,5 \times 10^3$, 0) zu den Tresp hinzugefügt (Verhältnis Tresp:Treg 1:1, 2:1, 4:1, 8:1, 1:0, 2:0). Die suppressive Kapazität wurde mit Hilfe eines Proliferationstests überprüft. In der Analyse zeigte sich, dass die Tresp durch die Färbung offenbar abstarben. Aufgrund dieser anhaltenden technischen Probleme kann keine Aussage über die Suppressionskapazität getroffen werden. Der Versuch soll daher nach geändertem Färbeprotokoll wiederholt werden.

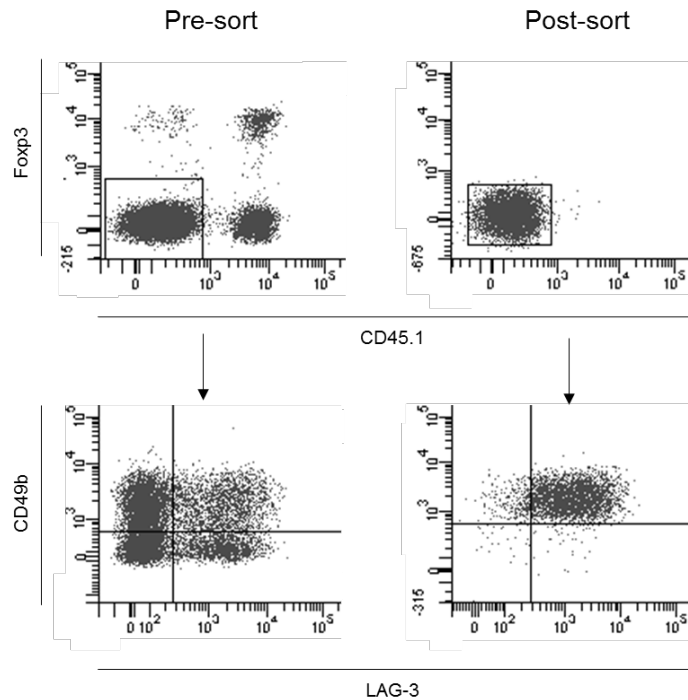


Abb.25: Population der Foxp3-CD49b+LAG-3+ T Zellen vor und nach durchflusszytometrischer Zellseparation. Analyse an Tag 7 nach MBP-Immunisierung der Empfängertiere (Tag 0) und Zelltransfer (Tag 1).

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Mechanismen auf CD4⁺ T Zell-Ebene zur Auslösung von hepatischer Autoimmunität führen und folglich für die Durchbrechung der hepatisch induzierten Toleranz relevant sind. Aus Vorarbeiten war bekannt, dass die Expression des Autoantigens der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) in der Leber zu Toleranz führt und die Mäuse vor einer EAE geschützt sind. Diese Toleranz wird durch regulatorische T Zellen (Treg) vermittelt, die für das Autoantigen, das Myelin Basische Protein (MBP) spezifisch sind (Lüth et al. 2008). Für unsere Analysen verwendeten wir CRP-MBP x tg4 Mäuse, die neben dem hepatischen MBP auch noch einen transgenen T Zell-Rezeptor exprimieren, der spezifisch für MBP ist. Tg4 Mäuse sind grundsätzlich für eine EAE-Induktion suszeptibel (Liu et al. 1995). Mit Hilfe des Modells CRP-MBP x tg4 wollten wir untersuchen, ob die beschriebene hepatische Toleranz gegenüber MBP bei zusätzlicher Anwesenheit MBP-spezifischer T Zellen persistiert und welche anderen Mechanismen zusätzlich zur Generierung regulatorischer T Zellen für die hepatische Toleranz relevant sind.

5.1. Charakterisierung des CRP-MBP x tg4 Mausmodells

Zunächst untersuchten wir unbehandelte Mäuse der Linie CRP-MBP x tg4 und konnten verifizieren, dass nahezu alle CD4⁺ T Zellen den transgenen MBP-spezifischen T Zell-Rezeptor exprimieren (Abb.2). Da die Immunantwort bezüglich MBP analysiert werden sollte, war diese Voraussetzung entscheidend. Weiter stellten wir fest, dass die MBP-spezifischen T Zellen nach Antigen-spezifischer und unspezifischer *in vitro* Stimulation in der Lage waren pro-inflammatorische Zytokine wie IFN- γ und IL-17 zu produzieren und keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe aufwiesen (Abb.3). Unsere Ergebnisse zeigten, dass das hepatisch exprimierte MBP offenbar keinen wesentlichen Einfluss auf die *in vitro* Stimulierbarkeit der MBP-spezifischen T Zellen hat, da die Unterschiede zur Kontrollgruppe nur gering ausgeprägt waren. Die pro-inflammatorische Kapazität hinsichtlich IFN- γ wurde durch die intrazelluläre Zytokinfärbung bestätigt. Hier lag nach unspezifischer Stimulation der Gesamtzellen der Anteil der IFN- γ -produzierenden CD4⁺ T Zellen aus der Leber mit rund 30% deutlich höher als aus der Milz mit unter 10% und es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (Abb.4). Dennoch ist bemerkenswert, dass in der Leber ein größerer Anteil als in der Milz zur IFN- γ -Produktion stimuliert werden konnte, da das Lebermilieu physiologisch eher zu Toleranz führt (Thomson und Knolle 2010). Eine

Messung des Anteils Zytokin-produzierender T Zellen in der Durchflusszytometrie nach Antigen-spezifischer Restimulation war aus technischen Gründen leider nicht möglich.

Da die CD4⁺ T Zellen unserer Versuchstiere *ex vivo* stimulierbar waren, stellten wir uns die Frage, ob *in vivo* in CRP-MBP x tg4 Mäusen spontane Immunreaktion gegen das MBP im ZNS oder in der Leber auftreten. In unseren Versuchen zeigten die Mäuse jedoch keine EAE-Symptomatik. Des Weiteren stellten wir fest, dass in den Mäusen mit hepatisch exprimiertem MBP kein idiopathisches entzündliches Geschehen in der Leber stattfand. Obwohl wie gezeigt nahezu alle T Zellen das MBP erkennen konnten und potenziell pro-inflammatorisch waren, wurden die T Zellen offenbar nicht aktiviert und keine Immunreaktion gegen das hepatische MBP induziert. Die leberinduzierte Toleranz war in den CRP-MBP x tg4 Mäusen somit persistent. Die CRP-MBP x tg4 Mäuse unterschieden sich demnach zunächst nicht von den CRP-MBP Mäusen, die nicht über den transgenen MBP-spezifischen T Zell Rezeptor verfügen (Lüth et al. 2008).

Treg spielen in der Regulation der EAE und in der Toleranzinduktion eine wesentliche Rolle. Da Lüth et al. zeigen konnten, dass hepatisch exprimiertes MBP zu Toleranz führt und dies von der Induktion Antigen-spezifischer Treg abhängig ist (Lüth et al. 2008), wollten wir untersuchen, ob in den CRP-MBP x tg4 Mäusen erhöhte Treg-Frequenzen vorlagen. Tatsächlich waren die Frequenzen der MBP-spezifischen Foxp3⁺ Treg in Leber und Milz im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (Abb.7). Die Befunde ließen vermuten, dass das hepatisch exprimierte MBP zu vermehrter Induktion von Treg führt. Allerdings wurde nicht sichergestellt, ob es sich dabei tatsächlich um induzierte Treg (iTreg) handelt. Da sich nTreg und iTreg bezüglich des Demethylierungsstatus am CpG-Motiv im Foxp3-Promoter unterscheiden, sollte eine solche Quantifizierung zukünftig stattfinden (Kim und Leonard 2007, Lal et al. 2008, Floess 2007). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, nTreg auch anhand des Transkriptionsfaktors Helios zu identifizieren (Thornton et al. 2010).

Im nächsten Schritt wollten wir analysieren, ob die T Zellen der CRP-MBP x tg4 Mäuse auch *in vivo* stimulierbar waren. In der Vergangenheit wurde bereits mithilfe des Des-TCR-Mausmodells versucht, eine Leber-spezifische Autoimmunität zu induzieren und somit eine Toleranzdurchbrechung zu erreichen. Doppelt transgenen Mäusen, die das K^b-Molekül selektiv auf Hepatozyten exprimieren und gleichzeitig über einen transgenen K^b-spezifischen T Zell Rezeptor verfügen, wurden Zellen appliziert, die sowohl K^b als auch IL-2 exprimieren, um so die Toleranz zu durchbrechen. Erst nach zusätzlicher Induktion eines entzündlichen Kontextes

mit einem Leber-spezifischen Pathogen wurde eine autoimmune Leberschädigung beobachtet (Limmer et al. 1998). Die Autoren schließen daraus, dass neben der Toleranzdurchbrechung auch ein entzündlicher Kontext vorliegen muss, um Autoimmunität zu induzieren. In einer weiteren Studie mit dem Des-TCR-Mausmodell, bei dem die spezifische Interaktion zwischen CD8 T Zellen und Hepatozyten über das MHC Klasse I Molekül K^b untersucht wurde, konnte die zuvor beobachtete Toleranz ebenfalls durch die Induktion einer lokalen Entzündung durchbrochen werden (Sacher et al. 2002).

Daher immunisierten wir die Versuchstiere mit MBP/CFA, um einen entzündlichen Kontext zu induzieren und überprüften, ob die T Zellen eine pro-inflammatorische Reaktion gegen das MBP in Leber und ZNS generieren können oder ob die Toleranz persistiert. Von besonderem Interesse war dabei, ob die Foxp3⁺ Treg, die wie gezeigt vermehrt vorliegen, einen effektiven Schutz vor Autoimmunität bieten können. In unseren Versuchen waren die CRP-MBP x tg4 Mäuse trotz MBP-Immunsierung weiter vor einer EAE geschützt, wohingegen die Kontrollgruppe typische EAE-Verläufe zeigte (Abb.8). Somit unterschied sich unser Mausmodell hinsichtlich der EAE-Induktion nicht von den CRP-MBP Mäusen, die nicht über den transgenen MBP-spezifischen T Zell Rezeptor verfügen (Lüth et al. 2008). Analysen an Tag 7 nach Immunisierung machten deutlich, dass in der Leber vereinzelt lymphozytäre Infiltrate vorlagen, im Vergleich zur Kontrollgruppe jedoch nur gering vermehrt (Abb.9). Dieser Befund wich von unserer Hypothese ab, dass die MBP-spezifischen T Zellen ihr Antigen in der Leber erkennen und vermehrt in das Lebergewebe infiltrieren. Zwischen den Versuchswiederholungen variierten die Entzündungsgeschehen in der Leber hinsichtlich der Quantität der lymphozytären Infiltrate. Diese Beobachtung ist womöglich auf die MBP-Immunsierung zurückzuführen: Die applizierten Emulsionen mit MBP-Peptid können Chargen-abhängig in ihrer Effektivität variieren. Die gemessenen Serumtransaminasen (ALT) lieferten keinen Hinweis auf eine Schädigung des Lebergewebes (keine Abbildung). Unklar blieb, warum der Anteil der CD4⁺ T Zellen an den Gesamtzellen in Leber und Milz im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindert war (Abb.10). Dies widersprach den histologischen Befunden. Die pro-inflammatorische CD4⁺ T Zell-Effektorfunktion der CRP-MBP x tg4 Mäuse war nach unspezifischer Restimulation *in vitro* vergleichbar mit der Kontrollgruppe der C57BL/6 x tg4 Mäuse (Abb.11 A+C). Nach MBP-spezifischer Restimulation hingegen wurden teilweise signifikant verminderte Zytokinproduktionen gemessen (Abb.11 B+D). Diese Tendenz zeigte sich auch hinsichtlich der IL-17-Produktion (Abb.12). Ebenso konnte bei der

intrazellulären Zytokinfärbung (Anteil IFN- γ - und IL-17-produzierender Zellen an CD4⁺ T Zellen) nach unspezifischer Restimulation kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Abb.13). Eine Antigen-spezifische Restimulation, die Aufschluss über die spezifische Effektorantwort geben kann, war aufgrund technischer Schwierigkeiten nur schwer realisierbar und konnte in diesen Versuchen nicht durchgeführt werden. Um die Ergebnisse aus den Zytokin-Messungen im Zellkulturüberstand zu bestätigen und den Anteil der IFN- γ - und IL-17-produzierenden T Zellen quantifizieren zu können, sollte dies zukünftig jedoch nachgeholt werden.

Unsere Befunde zeigten, dass die MBP-spezifischen Zellen der Tiere mit hepatisch exprimiertem MBP weniger responsiv für eine Antigen-spezifische Restimulierung waren. Auch wenn sie grundsätzlich pro-inflammatorische Zytokine produzieren konnten, schien das hepatisch exprimierte MBP graduell die Stimulierbarkeit der Zellen *ex vivo* zu beeinflussen und eine Verschiebung der Immunität zugunsten einer MBP-spezifischen Toleranz zu induzieren. Dies begründet vermutlich die verminderte Antigen-spezifische pro-inflammatorische Effektorantwort der T Zellen. Von besonderem Interesse war für uns nun, welche leberspezifischen Mechanismen auf T Zell-Ebene in unserem Mausmodell hierfür verantwortlich sind. Treg übernahmen dabei offenbar wichtige suppressive Funktion, da in Anwesenheit von CD25⁺ T Zellen keine pro-inflammatorische Zytokinproduktion im Zellkulturüberstand detektiert werden konnte (keine Abbildung). Unsere Ergebnisse waren zusätzlich in Hinblick auf die persistente Toleranz äußerst interessant: IFN- γ -produzierende Th1 Zellen und IL-17-produzierende Th17 Zellen gelten als verantwortliche pro-inflammatorische Zellpopulationen in der EAE, die in das ZNS infiltrieren (Siriam et al. 1982). Unsere Zellen zeigten zwar IFN- γ - und IL-17- Produktion *in vitro*, waren aber *in vivo* nach EAE-Induktion nicht in der Lage, eine EAE auszulösen.

Da die Mäuse auch nach MBP-Immunsierung gegenüber der EAE tolerant waren und regulatorische T Zellen für die hepatische Toleranz essenziell sind (Lüth et al. 2008), sollte auch in den Immunsierung-Versuchen der Treg-Anteil an CD4⁺ T Zellen analysiert werden. Tendenziell waren in den CRP-MBP x tg4 Mäusen erhöhte Frequenzen festzustellen, vor allem in der Leber (Abb.14). Die Gruppenunterschiede waren vergleichbar mit den Versuchen ohne Vorbehandlung. Dort lag aber tendenziell ein höheres Niveau der Treg-Frequenzen vor (Abb.6). Unsere Ergebnisse ließen vermuten, dass die moderat erhöhten Treg-Frequenzen auf das hepatisch exprimierte MBP zurückzuführen sind. Fraglich ist weiterhin, ob die MBP-

Immunisierung einen weiteren Einfluss auf die Treg-Induktion hat, da in den Immunisierungsversuchen tendenziell niedrigere Treg-Frequenzen vorliegen als in den Versuchen ohne Vorbehandlung. Unklar bleibt auch hier, in den Analysen nach MBP-Immunisierung, ob es sich bei der Treg-Population um iTreg oder nTreg handelt. In Studien am MOG-spezifischen EAE-Modell wurde eine solche Differenzierung durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass nach Immunisierung keine vermehrte Konversion von naiven T Zellen zu iTreg stattfand (Korn et al. 2007). Für weitere Analysen sollte eine solche Differenzierung auch in unseren Versuchen stattfinden. Esposito et al. konnten nach Immunisierung eine vermehrte Infiltration von Treg in Gewebe mit Autoantigenen beobachten. Die Foxp3⁺ Treg Zellen machten bis zu 50% der infiltrierenden CD4⁺ T Zellen aus. Allerdings waren die Foxp3⁺ Treg Zellen auch teilweise in der Lage pro-inflammatorische Zytokine zu produzieren, sodass der tolerogene Charakter dieser Zellpopulation zur Diskussion steht (Esposito et al. 2010). In unseren Versuchen betrug der Anteil der Treg im Antigen-exprimierenden Lebergewebe lediglich zwischen 3-5%. Es scheint somit evident, dass die Immunisierung die vermehrte Induktion von Effektor T Zellen bewirkt und im Vergleich zu den Versuchen ohne MBP-Immunisierung weniger naive T Zellen zu Treg werden. Diese Annahme kann durch Erkenntnisse von Curotto de Lafaille et al. unterstützt werden: Sie zeigten im Ovalbumin-spezifischen TCR-transgenen Mausmodell, dass im entzündlichen Kontext zwar eine simultane Induktion von pro-inflammatorischen T Zellen und iTreg vorliegt, jedoch vermehrt pro-inflammatorische T Zellen induziert werden (Curotto de Lafaille und Lafaille 2009). Da wir in unseren Versuchen lediglich die Frequenzen der jeweiligen Zellpopulationen erfassten, kann nur eine Aussage über das Verhältnis von regulatorischen zu Effektor T Zellen getroffen werden. Für eine Quantifizierung der absoluten Zellzahlen muss die Expansion der regulatorischen und Effektor T Zellen verglichen und die absoluten Zellzahlen erhoben werden. Des Weiteren ist hinsichtlich der Treg-Frequenzen bemerkenswert, dass trotz der nicht erhöhten Treg-Frequenzen dennoch ein Schutz vor EAE bestand. Fraglich war nun, ob die suppressive Kapazität der vorhandenen Treg ausreichte oder ob weitere T Zell-Populationen für die Toleranzpersistenz verantwortlich waren.

Um zu überprüfen, ob die Treg für die Persistenz der Toleranz essenziell waren und *in vivo* die pro-inflammatorische Effektorantwort unterdrückten oder ob weitere redundante Mechanismen beteiligt waren, wurden im nächsten Schritt Treg *in vivo* depletiert. Besonders interessierte uns die Frage, ob trotz MBP-Immunisierung und Treg-Defizit die Immunantwort gegen MBP

unterdrückt wird oder ob in ZNS und Leber entzündliche Vorgänge induziert werden können. Für die Depletion wurde der anti-CD25 Antikörper PC-61 verwendet, der spezifisch gegen CD25, der alpha-Kette des IL-2-Rezeptors gerichtet ist. Nach MBP-Immunisierung und Behandlung mit PC-61 wiesen die Versuchstiere keine EAE-Symptome und kein wesentliches Entzündungsgeschehen in der Leber auf (keine Abbildung). Unsere Ergebnisse machen deutlich, dass trotz Treg-Depletion eine Immunsuppression bezüglich MBP in den CRP-MBP x tg4 Mäusen stattfindet. Dies spricht dafür, dass nicht Treg allein für die Toleranz in CRP-MBP x tg4 Mäusen relevant sind, sondern weitere Treg-unabhängige Mechanismen vorhanden sein müssen. In der Vergangenheit wurde beschrieben, dass die Behandlung mit anti-CD25 AK zur funktionellen Inaktivierung von Treg führt (Kohm et al. 2006). Allerdings wird kontrovers diskutiert, ob die Anwendung des anti-CD25 AK PC-61 im Gegensatz zum anti-CD25 AK 7D4 darüber hinaus zu einer Depletion der CD25+ T Zellen und zur Dezimierung der Foxp3+ Population führt (Couper et al. 2007, Stephens und Anderton 2006, Zelenay und Demengeot 2006). Bei unseren Experimenten existierte weiterhin eine Population Foxp3+ T Zellen (Abb.15). Da Foxp3+ ein hinreichender Marker für murine T Zellen ist (Wan und Flavell 2005) und wir in unseren Versuchen den PC-61 Antikörper verwendeten, wollten wir überprüfen, ob die verbliebene Foxp3+ Treg-Population weiterhin suppressive Kapazität hat. Im *in vitro* Suppressionsassay wurde deutlich, dass die verbliebenen Foxp3+ T Zellen über nahezu keine suppressive Kapazität verfügten und die Behandlung mittels PC-61 daher effektiv war (Abb.16). Das Ergebnis verstärkt die Annahme, dass neben Treg weitere Zellpopulationen und Mechanismen für die Immunsuppression im CRP-MBP x tg4 Mausmodell verantwortlich sein müssen. Allerdings ist auch evident, dass CD25 nicht nur Oberflächenmarker für regulatorische Zellen ist, sondern auch auf aktivierten T Zellen exprimiert wird (Shipkova und Wieland 2012). Demnach kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Behandlung mit PC-61 auch pro-inflammatorische T Zellen depletiert wurden und somit die pro-inflammatorischen Signale nicht ausreichten, um eine detektierbare Effektorantwort gegen MBP zu generieren.

Das Zytokin TGF- β ist für die Induktion von Treg essenziell und kann in der Peripherie die Konversion von iTreg aus konventionellen non-Treg induzieren (Bilate und Lafaille 2012). Aus Vorarbeiten war bekannt, dass in der Leber TGF- β -abhängig induzierte MBP-spezifische Treg nach adoptivem Transfer in nicht-transgene Mäuse vor einem Ausbruch der EAE schützen konnten (Lüth et al. 2008). Um die Rolle der iTreg in den CRP-MBP x tg4 Mäusen zu analysieren, wurden Versuchstiere mit defizitärem TGF- β -Signalweg untersucht (CRP-MBP x

hCD2- $\Delta\kappa$ T β R II x tg4), deren T Zellen insensitiv für TGF- β sind. Nach Immunisierung mit MBP konnte keine EAE induziert werden. In der Leber waren nur vereinzelt entzündliche Infiltrate erkennbar und es konnte keine Schädigung des Lebergewebes festgestellt werden. Da eine Beteiligung von TGF- β bei der Generierung von nTreg im Thymus noch kontrovers diskutiert wird (Li und Flavell 2008), kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Versuchstiere weiterhin über nTreg verfügten. Es ist daher unklar, ob die Toleranz durch diese Population aufrechterhalten wird oder ob weitere regulatorische T Zell-Populationen eine Rolle spielen. Darüber hinaus ist der TGF- β -Signalweg nicht nur für die Induktion von iTreg relevant. Bekannt ist auch, dass naive T Zellen unter dem Einfluss von TGF- β in Kombination mit IL-6 zu pro-inflammatorischen IL-17-produzierenden Th17 Zellen differenzieren (Bettelli et al. 2008). Durch die Ausschaltung des TGF- β -Signalwegs wird demnach sowohl die Differenzierung von tolerogenen iTreg als auch von pro-inflammatorischen Th17 Zellen negativ beeinflusst. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die ausbleibenden entzündlichen Vorgänge auch auf die verminderte Population von pro-inflammatorischen Th17 Zellen zurückzuführen sind.

In der Vergangenheit wurde bereits die suppressive Kapazität des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 in der EAE beschrieben. So hatten CD4⁺CD25⁺ T Zellen, die aus IL-10-defizienten Mäusen isoliert wurden, keinen positiven Einfluss auf den Verlauf einer MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE (Montero et al. 2004). Darüber hinaus scheinen die potenziell tolerogenen Tr1 Zellen ihren regulatorischen Effekt hauptsächlich über IL-10 zu vermitteln und es wird vermutet, dass IL-10 auch an der Induktion von Tr1 Zellen beteiligt ist (Roncarolo et al. 2014, Groux et al. 1997). Aus diesem Grund nahmen wir an, dass sich die Inhibition der Wirkung von IL-10 auf die Antigen-spezifische Toleranz auswirkt und zu vermehrtem entzündlichen Geschehen führt. Um dies zu untersuchen, analysierten wir Mäuse der Linie CRP-MBP x *cd4*-DN-IL10R x tg4, deren T Zellen insensitiv für IL-10 sind. Nach MBP-Immunisierung wiesen die Versuchstiere über den Beobachtungszeitraum von 30 Tagen weder EAE-Symptome, noch hepatische Entzündungszeichen auf. Zur weiteren Überprüfung des IL-10-Einflusses auf die Toleranzpersistenz behandelten wir Tiere der Linie CRP-MBP x B10.PL mit einem Antikörper, der gegen den IL-10-Rezeptor gerichtet ist. *In vitro* konnte bereits mit Hilfe des Hepatitis B Virus-Mausmodell ein negativer Einfluss des anti-IL10-Rezeptor Antikörpers auf die IL-10-Produktion und die Tr1 Zell-Induktion verifiziert werden. Xu et al. kokultivierten naive CD4⁺ T Zellen mit Kupffer Zellen, die für eine Toleranzinduktion bedeutend sind (Crispe 2014,

Thomson und Knolle 2010). Die Zugabe von anti-IL10-Rezeptor Antikörper führte dort zu einer Verminderung sowohl der IL-10-Produktion als auch der Generierung von IL-10-produzierenden Foxp3⁺ Tr1 Zellen (Xu et al. 2013). In unserem Versuch lag nach 30 Tagen weiterhin eine Persistenz der Toleranz vor und es war keine Leberschädigung erkennbar. Einerseits sollte die *in vivo* Kapazität des Antikörpers in unserem Mausmodell überprüft werden. Andererseits kann darüber hinaus angezweifelt werden, ob IL-10 tatsächlich ein relevanter Marker für die Toleranzpersistenz in unserem Mausmodell ist. In den Versuchen fanden aufgrund der beobachteten persistierenden Toleranz keine weiteren Analysen statt. Die Ergebnisse zeigen jedoch zunächst, dass in unserem Mausmodell die isolierte Inaktivierung der IL-10-Wirkung nicht zur Durchbrechung der hepatisch induzierten Toleranz führt und demzufolge nicht das Zytokin IL-10 allein für die Toleranzpersistenz verantwortlich sein kann. Zunächst machen unsere Ergebnisse deutlich, dass die isolierte Inaktivierung der anti-inflammatorischen Zytokine TGF- β und IL-10 nicht für ein Durchbrechen der hepatischen Toleranz ausreicht. Des Weiteren führte die Depletion von Treg nicht zu Autoimmunität, auch wenn in Mäusen der Linie CRP-MBP x tg4 erhöhte Treg-Frequenzen nachgewiesen werden konnten.

5.2. Charakterisierung MBP-spezifischer T Zellen (tg4) nach Transfer in CRP-MBP

Mäuse

Durch unsere bisherigen Befunde wurde deutlich, dass die T Zellen der Linie CRP-MBP x tg4 *in vitro* stimulierbar waren und MBP-Spezifität aufwiesen. Allerdings waren die Zellen nach Stimulation nicht in der Lage, *in vivo* eine ausreichende Immunantwort gegen das MBP zu richten, um eine EAE oder Leberentzündung zu induzieren. Wir vermuteten, dass die endogenen tg4 Zellen durch das hepatisch exprimierte MBP Toleranz erwerben und keine hinreichende pro-inflammatorische Effektorantwort generieren können. Um dies auszuschließen, wurden nicht-tolerante Zellen aus tg4 Mäusen ohne hepatisch exprimiertes MBP isoliert, deren T Zellen jedoch MBP-spezifisch sind. Diese Zellen wurden in Mäuse transferiert, die über das hepatisch exprimierte MBP verfügten (CRP-MBP x B10.PL) und vorher mit MBP immunisiert wurden (Abb.1). Von besonderem Interesse war nun, ob die transferierten Zellen weiterhin ihren nicht-toleranten und letztlich pro-inflammatorischen Charakter beibehielten oder ob sie durch das hepatisch exprimierte MBP in den

Empfängertieren beeinflusst wurden und Toleranz erwarben. Die transferierten Zellen waren vermehrt in der Leber wiederzufinden (Abb.20). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die transferierten MBP-spezifischen T Zellen das Autoantigen in der Leber der Empfängertiere erkannten. Die Histologie und die Transaminasenwerte (ALT) deuteten darüber hinaus auf entzündliches Geschehen und Schädigung des Lebergewebes mit deutlichem Unterschied zur Kontrollgruppe hin (Abb.18, Abb.19C). Diese Beobachtung korrelierte jedoch nicht mit der Anzahl der Leberlymphozyten. Hier war kein Unterschied zur Kontrollgruppe erkennbar (Abb.19A). Der Anteil IFN- γ -produzierender Spenderzellen war in den Mäusen mit hepatisch exprimiertem MBP im Vergleich zur Kontrollgruppe größer. Bemerkenswert ist, dass ein großer prozentualer Anteil von bis zu 90% der Spenderzellen pro-inflammatorisch wirken kann (Abb.21A+B). Dieser Anteil ist auch in Hinblick auf die Versuche mit endogenen tg4 Zellen (CRP-MBP x tg4) merklich vergrößert (Abb.13). Wir vermuteten, dass die nicht-toleranten MBP-spezifischen transferierten Zellen in den CRP-MBP x B10.PL Empfängertieren durch die Immunisierung mit MBP/CFA aktiviert werden und als aktivierte Zellen in die Leber wandern. Dort generieren sie eine pro-inflammatorische Effektorantwort gegen das MBP. Die oben erwähnten Befunde bezüglich der intrazellulären IFN- γ -Produktion bestätigen unsere Hypothese: Die endogenen MBP-spezifischen T Zellen können lediglich eine verminderte pro-inflammatorische Effektorantwort generieren und scheinen somit durch das hepatisch exprimierte MBP *in vivo* Toleranz erworben zu haben, wie schon in den Immunisierungsversuchen mit Mäusen der Linie CRP-MBP x tg4 deutlich wurde. Die transferierten, ursprünglich nicht-toleranten T Zellen hingegen können vermehrt pro-inflammatorische Zytokine produzieren und sind offenbar in der Lage stärkere Entzündungsvorgänge auszulösen. Auffällig ist jedoch, dass der Anteil IFN- γ -produzierender Zellen nach MBP-spezifischer Restimulation weitaus geringer ist (Abb.21C). Darüber hinaus produzierten nach Antigen-spezifischer Restimulation nahezu keine transferierten Zellen das Zytokin IL-17 (Abb.22 C+D). Allerdings wurde die Antigen-spezifische Restimulation lediglich in einem Versuch durchgeführt, sodass eine Wiederholung nötig ist.

Die pro-inflammatorische Effektorantwort der transferierten Zellen reicht jedoch offenbar nicht aus, um eine dauerhafte Entzündung zu induzieren: In einem weiteren Versuch fand eine Analyse an Tag 15 nach Zelltransfer statt. Hier waren deutlich verringerte Entzündungsparameter festzustellen. So lag ein wesentlich niedrigerer mHAI-Score vor, die Werte der Leberlymphozyten und Transaminasen lagen im Normalbereich und die

Versuchstiere zeigten keine EAE-Symptomatik (keine Abbildung). Offenbar nimmt das entzündliche Geschehen von Tag 7 zu Tag 15 deutlich ab. Die induzierte Entzündung war demnach nur transient und die Toleranz hingegen persistent. Die Befunde zeigen, dass durch den Transfer nicht-toleranter Antigen-spezifischer T Zellen die Toleranz nicht durchbrochen werden kann. Die transferierten T Zellen haben zwar das Potenzial pro-inflammatorisch zu wirken; dies scheint jedoch nicht ausreichend für eine längerfristige Entzündungsinduktion zu sein. Die Beobachtungen ließen uns vermuten, dass die transferierten nicht-toleranten T Zellen nach Aktivierung durch MBP/CFA nicht nur pro-inflammatorisch wirken, sondern teilweise auch vom Immunsystem der Empfängertiere langfristig eliminiert werden oder darüber hinaus einen toleranten Phänotyp annehmen. In vorherigen Mausstudien, bei denen mittels der TLR-Liganden CpG und Poly(I:C) ein Entzündungsgeschehen in der Leber induziert wurde, konnte bereits gezeigt werden, dass transferierte autoreaktive CD8 T Zellen trotz inflammatorischem Kontext vom Immunsystem der Empfängertiere eliminiert werden und die Immunhomöostase in der Leber erhalten bleibt (Béland et al. 2012). Um zu überprüfen, ob die transferierten CD4+ T Zellen eliminiert werden oder einen toleranten Phänotyp annehmen, erfassten wir einerseits die Frequenzen der Treg und als weiteren regulatorischen T Zelltyp andererseits die Tr1-phänotypischen Zellfrequenzen. Es ist bekannt, dass Tr1 Zellen, die peripher induziert werden, an der Regulation von Immunsuppression beteiligt sind und Autoimmunität unterdrücken können (Roncarolo und Battaglia 2007, Groux et al. 1997). Aus diesem Grund wollten wir untersuchen, ob diese Population auch in unserem Mausmodell an der Antigen-spezifischen Toleranz beteiligt ist. Andere tierexperimentelle Studien, in denen *in vitro* generierte Antigen-spezifische Tr1 Zellen vor Exazerbation der EAE-Symptome im Ovalbumin-Mausmodell schützen konnten bzw. im Colitis-Mausmodell zur Immunsuppression führten, unterstützen unsere Annahme, dass die Population der Tr1-phänotypischen Zellen an der Toleranzpersistenz beteiligt sein könnte (Barrat et al. 2002, Groux et al. 1997). Auch im ConA-induzierten Hepatitis Mausmodell konnte nach Vorbehandlung mit ConA eine vermehrte Induktion von Tr1 Zellen beobachtet werden. Die Tr1 Zellen zeichneten sich durch hohe IL-10-Produktion, niedrige IL-4-Produktion und negative Foxp3-Expression aus und konnten nach adoptivem Transfer in naive Mäuse eine ConA-induzierte Leberschädigung deutlich reduzieren (Ye et al. 2009). Wenngleich die Identifikation von Tr1 Zellen in der Vergangenheit meist nur über die spezifische Zytokinproduktion und die negative Expression von Foxp3 erfolgte, aber eine genauere Charakterisierung mangels spezifischer Marker nicht möglich schien, stellten

Gagliani et al. kürzlich erstmals eine Möglichkeit der Tr1 Zell-Charakterisierung anhand der Koexpression der Oberflächenmarker CD49b und LAG-3 vor (Gagliani et al. 2013). Mithilfe dieser Färbung konnten wir zeigen, dass der Anteil der CD49b+LAG-3+ Tr1-phänotypischen Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe in Leber und Milz signifikant erhöht war (Abb.23). Auch Ye et al. konnten in ihrer Studie nach ConA-Vorbehandlung Tr1-Frequenzen in der Leber von über 30% feststellen (Ye et al. 2009). Unsere Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass ein Teil der transferierten T Zellen einen toleranten Phänotyp, in diesem Falle einen Tr1-Phänotyp, erwirbt. Interessanterweise zeigte nur ein geringer Teil der transferierten Zellen einen Treg-Phänotyp (keine Abbildung).

Besonders auffallend an unseren Analysen ist, dass vor allem in der Leber ein großer Teil der CD4+ T Zellen von rund 30% den Tr1-Phänotyp aufwies (Abb.23B). Unsere Beobachtung, dass die Leber, etwa im Vergleich zur Milz, zur Induktion von Tr1 Zellen prädestiniert scheint, wird durch eine Studie im Hepatitis B Virus-Mausmodell unterstützt. Dort konnten transferierte hepatische IL-10-produzierende Foxp3- Tr1 Zellen schneller eine Immunität bezüglich Hepatitis B inhibieren, als Tr1 Zellen aus der Milz (Xu et al. 2013). Auch die Zytokin-Messungen im Zellkulturüberstand von IL-10 unterstützen die Befunde (Abb.24), da Tr1 Zellen ihre immunsupprimierende Wirkung hauptsächlich über IL-10 vermitteln (Roncarolo et al. 2014, Groux et al. 1997). Hier lag bei CRP-MBP x B10.PL Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant höhere IL-10-Produktion vor. Zwar schlossen wir für die IL-10-Messungen im Zellkulturüberstand die CD25+ Zellen aus, sodass Treg wohl nicht zur IL-10-Produktion beitragen. Eine weitere Differenzierung zwischen den restlichen nicht-parenchymatösen Leberzellen und zwischen Spender- und Empfängerzellen war jedoch nicht möglich. Mittlerweile ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor Blimp-1 (B lymphocyte-induced maturation protein 1) und das Zytokin IL-27 an der Regulation der IL-10-Produktion von Tr1 Zellen beteiligt sind. Dabei wirkt IL-27 offenbar anti-inflammatorisch, indem es den Transkriptionsfaktor Blimp-1 aktiviert, der wiederum die IL-10-Produktion der Tr1 Zellen hochreguliert. (Cretney et al. 2011, Vasanthakumar und Kallies 2013). Als weitere beteiligte Transkriptionsfaktoren, die an diesem Signalweg beteiligt sind, werden STAT3 und Egr-2 diskutiert (Iwasaki et al. 2013, Stumhofer et al. 2007, Wang et al. 2011). Darüber hinaus stehen aber noch weitere Regulationsmechanismen der IL-10-Produktion zur Diskussion: Jun-O et al. konnten in ihren Studien zeigen, dass auch das Zytokin IL-6 zu einer IL-10-Produktion von Tr1-charakteristischen Zellen (IL-10⁺IFN γ ⁻IL-2⁻IL-4⁻IL-17⁻Foxp3⁻) führte und diese Induktion

unabhängig von IL-27 und TGF- β war (Jun-O et al. 2013). Im MOG-spezifischen EAE-Mausmodell konnte die Relevanz des Transkriptionsfaktors Blimp-1 für die Regulation der EAE gezeigt werden: Blimp-1 knock-out Mäuse wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe exazerbierte EAE-Verläufe auf (Lin et al. 2014). Aus diesem Grund scheint eine Erfassung der Blimp-1-Expression in unseren zukünftigen Versuchen sinnvoll, um eine differenziertere Analyse der IL-10-Produktion und -Regulation durch Tr1 Zellen zu ermöglichen. Neumann et al. zeigen in ihrer Studie, dass auch Th1 Zellen Blimp-1-abhängig das immunsuppressive Zytokin IL-10 produzieren können. Es wird diskutiert, dass dieser Mechanismus in akuten Immunreaktionen der Selbstlimitierung dient (Neumann et al. 2014). Daher kann bei unseren IL-10 Messungen nicht ausgeschlossen werden, dass auch Th1 Zellen, die durch die MBP-Immunsierung aktiviert wurden, zur IL-10-Produktion beitragen.

Eine weitere Möglichkeit, um die IL-10-produzierenden Tr1 Zellen genauer zu detektieren ist die Verwendung von IL-10-Reportermausen. Bei Tieren der Linie IL-10-IRES-EGFP (tiger) kann mittels grün fluoreszierendem Protein die IL-10-Produktion einer Zelle mit Hilfe der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden (Bouabe 2012, Kamanaka et al. 2006). Zukünftig wollen wir unser Mausmodell mit dieser Reporterlinie kreuzen, um die Tr1-phänotypische Population noch differenzierter zu analysieren. Unsere bisherigen Analysen zeigen dennoch, dass ein großer Teil der transferierten Zellen in den Spendertieren einen CD49b+LAG-3+ Tr1-Phänotyp erwirbt und es lässt sich aufgrund der beobachteten persistierenden Toleranz bezüglich der EAE vermuten, dass diese Population an der Aufrechterhaltung der Toleranz mitwirkt. Anhand der Koexpression der Oberflächenmarker CD49b und LAG-3 gelang es uns die Foxp3-CD49b+LAG-3+ T Zellen nicht nur zu färben, sondern mittels Durchflusszytometrie sogar zu isolieren (Abb.25).

Da die Tr1-phänotypischen Zellen in unserem Mausmodell vermutlich für die Toleranz von Bedeutung sind und, wie oben dargestellt, ein großer Anteil der transferierten T Zellen den Tr1-Phänotyp erwirbt, wollten wir diese Population auch in den Versuchen ohne Transfer erfassen. Die Frequenzen der Tr1 Zellen waren in den Versuchen ohne Vorbehandlung sowie in den Versuchen mit Immunsierung mit unter 1% kaum detektierbar. Dies macht deutlich, dass nicht die endogenen T Zellen, sondern vor allem die vormals nicht-toleranten transferierten Zellen den Tr1-Phänotyp erwerben.

Um anschließend die Tr1-phänotypischen Zellen genauer zu charakterisieren, wollten wir die suppressive Kapazität dieser Population mittels Suppressionsassay überprüfen. Auch wenn die

Isolation anhand der Oberflächenmarker CD49b und LAG-3 erfolgreich war (Abb.25), lieferte der Suppressionsassay aufgrund technischer Probleme keine verwertbaren Ergebnisse: Hierbei führte zunächst die Färbung der Responder T Zellen mit CellTrace CFSE oder CellTrace Violet stain auch nach abgeschwächtem Färbeprotokoll zu einem Zelluntergang der Responder T Zellen. Darüber hinaus bleibt bezüglich der CD49 und LAG-3 Oberflächenfärbung unklar, ob die Färbung mittels Antikörpern eine eingeschränkte oder gestörte Funktionalität der Tr1-phänotypischen Zellen zur Folge haben kann. Zukünftig soll der Versuch mit optimiertem Färbeprotokoll der Responder T Zellen wiederholt werden, um eine Aussage über die immunsupprimierende Kapazität der Tr1-phänotypischen Zellen treffen zu können.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass für die Auslösung von hepatischer Autoimmunität offenbar verschiedene Mechanismen bedeutend sind. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die isolierte Ausschaltung tolerogener Faktoren nicht für eine Induktion von hepatischer Autoimmunität und demnach für ein Durchbrechen der hepatischen Toleranz ausreicht. Zwar konnten wir in Mäusen der Linie CRP-MBP x tg4 erhöhte Treg-Frequenzen nachweisen; eine Depletion dieser Population führte jedoch nicht zu Autoimmunität. Möglicherweise scheint die periphere Induktion von Tr1 Zellen aus naiven T Zellen ebenfalls eine Rolle in der Persistenz der hepatischen Toleranz zu spielen. Darüber hinaus machen unsere Ergebnisse deutlich, dass die isolierte Hemmung der anti-inflammatorischen Zytokine TGF- β und IL-10 nicht zur Auslösung von Autoimmunität führt. Es ist daher davon auszugehen, dass eine Kombination der genannten Faktoren für die Induktion und Persistenz der hepatischen Toleranz verantwortlich ist.

5.3. Ausblick

Zur weiteren Analyse der relevanten auslösenden Mechanismen von Autoimmunität in der Leber wollen wir zunächst untersuchen, inwiefern die kombinierte Hemmung anti-inflammatorischer Faktoren (Treg und IL-10 bzw. Tr1 Zellen und TGF- β) in den CRP-MBP x tg4 Mäusen hepatische Autoimmunität auslösen kann. Zu diesem Zweck wollen wir eine *in vivo* Treg-Depletion in Mäusen der Linie CRP-MBP x *cd4*-DN-IL10R x tg4 sowie der Linie CRP-MBP x hCD2- $\Delta\kappa$ T β R II x tg4 durchführen und versuchen durch MBP-Immunsierung eine EAE zu induzieren. Weiterführend wollen wir analysieren, inwiefern das spezifische

Zytokinmilieu in der Leber die Induktion dieser regulatorischen Zellpopulation begünstigt. So ist beispielsweise zu überprüfen, welche Rolle IL-6, IL-27 und PD-L1, neben IL-10 und TGF- β , spielen, die von den verschiedenen leberresidenten Antigen-präsentierenden Zellen produziert bzw. exprimiert werden (Crispe 2014, Matta et al. 2012, Perez et al. 1997, Probst et al. 2005, Thomson und Knolle 2010, Yu et al. 2004).

Zur weiteren Charakterisierung der Tr1-phänotypischen Population, die nach Transfer in den Spendertieren vorlag, soll zunächst mithilfe eines modifizierten Färbeprotokolls und anschließendem Suppressionsassay die suppressive Kapazität dieser Zellpopulation *in vitro* analysiert werden. Um weiterführend auch die suppressive Kapazität *in vivo* zu analysieren, sollen die transferierten Tr1-phänotypischen Zellen wiederum isoliert und in nicht-transgene Mäuse transferiert werden, die für eine EAE suszeptibel sind. Es gilt dann zu überprüfen, inwiefern die Tr1-phänotypischen Zellen vor einer EAE schützen können. Aus vergangenen Studien ist bekannt, dass die periphere Induktion von MBP-spezifischen CD4+CD25+Foxp3+ Treg von hepatischer MBP-Expression, nicht aber von MBP-Expression in der Haut abhängig ist (Lüth et al. 2008). Dementsprechend gilt es zu überprüfen, ob die periphere Konversion der transferierten Tr1-phänotypischen Zellen ebenfalls durch die hepatische MBP-Expression bedingt ist. Hierfür sollen Mäuse der Linie K5-MBP x tg4 als Kontrollgruppe dienen, die das MBP lediglich in der Haut exprimieren.

Es ist bekannt, dass Th1 Zellen, neben Th17 Zellen, für die Genese der EAE verantwortlich sind. In vorherigen Studien im MOG-spezifischen Mausmodell wurde gezeigt, dass durch adoptiven Transfer von Antigen-spezifischen Th1 Zellen und der zusätzlichen Applikation von Pertussistoxin eine EAE induziert werden kann (Sriram et al. 1982, Jäger et al. 2009). Aus diesem Grund wollen wir überprüfen, ob der Transfer von bereits differenzierten Th1 Zellen, die *in vitro* mittels IL-12 und anti-IL-4 aus naiven MBP-spezifischen CD4+ T Zellen generiert werden, in Mäusen der Linie CRP-MBP x B10.PL zu einem EAE-Ausbruch führt. Des Weiteren ist dabei äußerst interessant, ob die bereits differenzierten Th1 Zellen in den Spendertieren durch das hepatisch exprimierte MBP einen tolerogenen Phänotyp annehmen können und zu Treg oder Tr1 Zellen differenzieren. Als weitere Modifikation des Transferversuchs wollen wir die Spendertiere (tg4) mit MBP/CFA immunisieren, um so eine *in vivo* Differenzierung der MBP-spezifischen T Zellen zu erreichen und deren Wirkung und mögliche weitere Differenzierung in den CRP-MBP Empfängertieren zu analysieren.

Darüber hinaus soll das Leitzytokin der Tr1 Zellen, das IL-10, in dieser Population detektiert

werden. Durch Kreuzung der Spenderlinie tg4 mit IL-10 Reportermäusen der Linie IL-10-IRES-EGFP (tiger) wollen wir die IL-10-Produktion der transferierten Tr1-phänotypischen Zellen im Durchflusszytometer bestimmen und für weitere Transferversuche nutzen.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Mechanismen auf CD4⁺ T Zellebene zur Auslösung von hepatischer Autoimmunität führen und folglich für die Durchbrechung von hepatisch induzierter Toleranz relevant sind. Als Mausmodell für unsere Analysen dienten CRP-MBP x tg4 Mäuse, die zusätzlich zum hepatisch exprimierten MBP über einen MBP-spezifischen T Zell-Rezeptor und somit über autoreaktive MBP-spezifische T Zellen verfügen. Wir konnten zeigen, dass nahezu alle CD4⁺ T Zellen von Mäusen dieser Linie den transgenen MBP-spezifischen T Zell Rezeptor exprimierten und dass die MBP-spezifischen T Zellen nach Antigen-spezifischer und unspezifischer *in vitro* Stimulation pro-inflammatorische Zytokine wie IFN- γ und IL-17 produzieren konnten. Allerdings waren die Mäuse weiterhin vor einer EAE und Leberentzündung geschützt, auch nach EAE-Induktion mittels MBP-Immunsierung. Zudem fanden sich in den CRP-MBP x tg4 Mäusen erhöhte Frequenzen MBP-spezifischer Treg. Nach *in vivo* Treg-Depletion mittels anti-CD25 Antikörper (PC-61) waren die Mäuse weiterhin vor einer EAE und Leberentzündung geschützt. Ebenso konnte in Mäusen, die aufgrund TGF- β -insensitiver T Zellen eine defizitäre Induktion von peripheren Treg aufwiesen (CRP-MBP x hCD2- Δ κT β R II x tg4), keine EAE oder Leberentzündung induziert werden. Auch bei defizitärer Wirkung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10, entweder durch Behandlung mit anti-IL-10-Rezeptor Antikörper oder bei IL-10-insensitiven T Zellen (CRP-MBP x *cd4*-DN-IL10R x tg4), überdauerte die Toleranz. Da die T Zellen der CRP-MBP x tg4 Mäuse zwar MBP-spezifisch *in vitro* stimulierbar waren, aber *in vivo* keine EAE oder Leberentzündung induzieren konnten, vermuteten wir, dass die endogenen T Zellen durch das hepatisch exprimierte MBP Toleranz erworben hatten. Um zu untersuchen, ob nicht-tolerante MBP-spezifische CD4⁺ T Zellen in Mäusen mit hepatisch exprimiertem MBP Toleranz erwerben, transferierten wir MBP-spezifische CD4⁺ T Zellen aus tg4 Mäusen in CRP-MBP Mäuse. Wir konnten zeigen, dass ein großer Teil der transferierten Zellen einen Tr1-ähnlichen Phänotyp annahm (CD49b+LAG-3+Foxp3-) und somit das hepatisch exprimierte MBP zur peripheren Induktion einer potenziell anti-inflammatorischen Tr1-Population führte. Die Versuchstiere entwickelten nach Transfer keine EAE, jedoch konnten transient leicht erhöhte Transaminasen und entzündliche Infiltrate in der Leber nachgewiesen werden.

Unsere Befunde machen deutlich, dass die isolierte Hemmung anti-inflammatorischer Zytokine wie TGF- β und IL-10 nicht zur Durchbrechung von hepatischer Toleranz ausreicht und nicht allein Treg für die Aufrechterhaltung der Antigen-spezifischen Toleranz verantwortlich sein

können. Darüber hinaus scheint die periphere Konversion von CD4⁺ T Zellen zu Tr1-phänotypischen Zellen ein weiterer möglicher Mechanismus hepatisch induzierter Toleranz zu sein. Somit ist davon auszugehen, dass eine Kombination der genannten Faktoren für die Induktion und Persistenz der hepatischen Toleranz verantwortlich ist.

7. Abstract

The liver is able to induce antigen-specific tolerance. Regulatory T cells (Treg) are known to be important mediators in the process of inducing hepatic tolerance. In a mouse model of autoimmune neuroinflammation, the Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE), it was shown that hepatic expression of myelin basic protein (MBP) led to antigen-specific tolerance and protection from EAE induction. This tolerance was mediated by TGF- β -induced MBP-specific Treg (Lüth et al. 2008).

In this work, we wanted to identify the CD4 T cell mechanisms that are responsible for the induction of hepatic autoimmunity and consequently for the breakthrough of hepatic tolerance. In our studies, we used the CRP-MBP x tg4 mouse model that is characterized by autoreactive MBP-specific T cells due to a transgenic T cell receptor and by MBP expression in the liver. We hope to provide answers to the following questions:

1. Do CRP-MBP x tg4 mice feature MBP-reactive T cells that recognize MBP in the central nervous system (CNS) and in the liver and does this result in spontaneous inflammation in the CNS or the liver?
2. Do these MBP-reactive T cells induce an inflammatory response against MBP in CNS and liver after EAE induction by immunization with MBP?
3. How important are Treg and the cytokines IL-10 and TGF- β for the emergence and maintenance of hepatic tolerance?
4. Do naive MBP-specific T cells evolve to either pro-inflammatory T cells (Th1, Th17) or regulatory T cells (Treg, Tr1) after being transferred in mice with hepatic MBP expression?

Our studies show that CD4 T cells of CRP-MBP x tg4 mice consistently express the transgenic MBP-specific T cell receptor. Furthermore, the MBP-specific T cells were able to produce pro-inflammatory cytokines as IFN- γ and IL-17 after antigen-specific and non-specific *in vitro* stimulation. However, CRP-MBP x tg4 mice were consistently protected from EAE induction. No inflammatory response was detected in the liver, even after MBP immunization. Additionally, we found increased MBP-specific Treg frequencies in CRP-MBP x tg4 mice. In order to examine the importance of Treg for hepatic tolerance, we analyzed CRP-MBP x tg4 mice that had been treated with anti-CD25 antibody (PC-61) for *in vivo* depletion of Treg. In these mice no EAE was inducible and there was no inflammatory response in the liver.

Likewise, CRP-MBP x hCD2- $\Delta\kappa$ T β R II x tg4 mice with impaired peripheral Treg induction due to TGF- β -insensitive T cells were consistently protected from EAE and inflammation of the liver.

Hepatic tolerance was also persistent in mice with impaired signalling of the anti-inflammatory cytokine IL-10: CRP-MBP x tg4 mice treated with anti-IL-10-receptor antibody as well as mice with IL-10-insensitive T cells CRP-MBP x *cd4*-DN-IL10R x tg4 showed persistent tolerance.

As T cells of CRP-MBP x tg4 mice were MBP-specific and reactive to stimulation but not susceptible to EAE or liver inflammation *in vivo*, we supposed that the endogenous T cells were consistently tolerant due to the hepatic MBP expression. To exclude potentially confounding effects due to inherent tolerance of the T cells in these mice, we transferred non-tolerant MBP-specific CD4 T cells from tg4 mice into mice with hepatic MBP expression (CRP-MBP x B10.PL). We found that a large proportion of the transferred cells developed a Tr1-like-phenotype (CD49b+LAG-3+Foxp3-), suggesting that hepatic expression of MBP might induce an anti-inflammatory Tr1-population. After cell transfer the mice were protected from EAE. Concerning liver inflammation we found inflammatory infiltrates in the liver and slightly elevated transaminases in the blood.

Our findings show that neither the isolated inhibition of anti-inflammatory cytokines, such as TGF- β and IL-10, nor Treg impairment alone are sufficient causes for breaking hepatic tolerance. Moreover, the peripheral conversion of CD4 T cells to Tr1-like cells appears to be an additional mechanism of liver tolerance. However, the exact mechanisms of liver tolerance remain unclear. We thus suppose that a combination of the mentioned factors is responsible for induction and persistence of hepatic tolerance.

8. Abkürzungsverzeichnis

AIH	Autoimmune Hepatitis
AK	Antikörper
ALT	Alanin-Aminotransferase
APC	Antigen-präsentierende Zelle
Blimp-1	B lymphocyte-induced maturation protein 1
BSA	Bovines Serumalbumin
CFA	Komplettes Freund'sches Adjuvans
CFSE	Carboxyfluorescein succimidyl ester
CNS	Central Nervous System
ConA	Concavalin
CRP	C-reaktives Protein
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
CXCL	Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand
DC	Dendritische Zelle
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
ELISA	Enzyme-linked immunsorbent assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetales Kälberserum
Foxp3	Forkhead-Box-Protein 3
GARP	Glycoprotein A repetitions predominant
GFP	Green Fluorescent Protein
ICOS	Inducible T cell CoStimulator
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
iTreg	Induzierte regulatorische T Zelle
Jak	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KC	Kupfferzelle
Ko	Knockout
LAG-3	Lymphocyte-activation gene 3
LAP	Latency-Associated Peptide
LPS	Lipopolysaccharid
LSEC	Sinusoidale Endothelzelle der Leber
MACS	Magnet Activated Cell Sorting
MBP	Myelin Basisches Protein
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MS	Multiple Sklerose
NFκB	Nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B cells

NPC	Nichtparenchymatöse Zellen
nTreg	Natürliche regulatorische Zellen
PBC	Primär biliäre Zirrhose
PBS	Phosphate Buffered Saline
PD-1	Programmed death-1
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PFA	Paraformaldehyd
PLP	Proteolipid Protein
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
RT	Raumtemperatur
SCID	Severe combined Immunodeficiency
STAT	Signal transducers and activators of transcription
T-bet	T-box transcription factor TBX21
TCR	T Zell-Rezeptor
TGF- β	Transforming growth factor- β
Th	T Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tyk	Tyrosin Kinase
ZNS	Zentrales Nervensystem

9. Literaturverzeichnis

Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem.* 2003;278:1910–1914.

Akdis M. T-cell tolerance to inhaled allergens: mechanisms and therapeutic approaches. *Expert Opin Biol Ther.* 2008;8:769–777.

Alstier AL, Meiffren G, Freeman S, Hafler DA. Alterations in CD46-mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 2006;116:3252–3257.

Andersson J, Tran DQ, Pesu M, Davidson TS, Ramsey H, O’Shea JJ, et al. CD4⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF- β -dependent manner. *J Exp Med.*

2008;205:1975-1981.

Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGF- β activation. *J Cell Sci.* 2003;116:217–224.

Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med.* 2007;204:1849–1861.

Aron JH, Bowlus CL. The immunobiology of primary sclerosing cholangitis. *Semin Immunopathol.* 2009 Sep;31(3):383–397.

Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med.* 1999;190:995–1004.

Awasthi A, Carrier Y, Peron JP, Bettelli E, Kamanaka M, Flavell RA, Kuchroo VK, Oukka M, Weiner HL. dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat Immunol.* 2008;8:1380–1389.

Bacchetta R, Bigler M, Touraine JL, Parkman R, Tovo PA, Abrams J, De Waal Malefyt R, De Vries JE, Roncarolo MG. High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* 1994;179:493–502.

Bacchetta R, De Waal, Malafijt R, Yssel H, Abrams J, De Vries JE, Spits H, Roncarolo MG. Host-reactive CD4⁺ and CD8⁺ T cell clones isolated from a human chimera produce IL-5, IL-2, IFN- γ and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor but not IL-4. *J Immunol.* 1990;144:902–908.

Bacchetta R, Sartirana C, Levings MK, Bordignon C, Narula S, Roncarolo MG. Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines. *Eur J Immunol.* 2002; 32(8):2237–2245.

Bamboate ZM, Stableford JA, Plitas G, Burt BM, Nguyen HM, Welles AP et al. Human liver dendritic cells promote T cell hyporesponsiveness. *J Immunol*, 182 (2009), pp. 1901–1911.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998 Mar;392(6673):245–252.

Baron U, FLoess S, Wieczorek G et al. DNA methylation in the human Foxp3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur J Immunol*. 2007;37(9):2378–2389.

Barrat, FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF, de Waal-Malefyt R, Coffman RL, Hawrylowicz CM, O’Garra A. 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. *J. Exp. Med*. 2002;195:603.

Battaglia M, Gregori S, Bacchetta R, Roncarolo MG. Tr1 cells: from discovery to their clinical application. *Semin Immunol*. 2006 Apr;18(2):120–127.

Becher B, Durell BG, Noelle J. IL-23 produced by CNS-resident cells controls T cell encephalitogenicity during the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest*. 2003;112:1186–1191.

Béland K, Lapierre P, Djilali-Saiah I, Alvarez F. Liver restores immune homeostasis after local inflammation despite the presence of autoreactive T cells. *PLoS One*. 2012;7(10): e48192. doi: 10.1371/journal.pone.0048192.

Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*. 2001;27:20–21.

Bensinger SJ, Bandeira A, Jordan MS, Caton AJ, Laufer TM. Major histocompatibility

complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)25(+) immunoregulatory T cells. *J. Exp. Med.* 2001;194:427–438.

Bertolino P, Trescol-Biemont MC; Rabourdin-Combe C. Hepatocytes induce functional activation of naïve CD8+ T lymphocytes but fail to promote survival. *Eur J Immunol.* 1998;28:221–236.

Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 2006;441:235–238.

Bettelli E, Sullivan B, Szabo SJ, et al. Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. 2004;200:79–87.

Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of Th17 cells. *Nature.* 2008;453:1051–1057.

Böttcher JP, Knolle PA, Stabenow D. Mechanisms balancing tolerance and immunity in the liver. *Dig Dis.* 2011;29:384–390.

Bogdanos DP, Gao B, Gershwin ME. Liver immunology. *Compr Physiol.* 2013 Apr;3(2):567–598.

Bouabe H. Cytokine reporter mice: the special case of IL-10. *Scand J Immunol.* 2012 Jun;75(6):553–567.

Breous E, Somanathan S, Vandenberghe LH, Wilson JM. Hepatic regulatory T cells and Kupffer cells are crucial mediators of systemic T cell tolerance to antigens targeting murine liver. *Hepatology.* 2009;50:612–621.

Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paeper B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder

of the scurfy mouse. *Nat Genet.* 2007;27:68–73.

Calne RY, Sells RA, Pena JR, Davis DR, Millard PR, Herbertson BM *et al.* Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature.* 1969;223:472–476.

Calne RY, White HJ, Binns RM, Herbertson BM, Millard PR, Pena J, et al. Immunosuppressive effects of the orthotopically transplanted porcine liver. *Tranplant Proc.* 1969;1:321–324.

Cantor HM, Dumont AE. Hepatic suppression of sensitization to antigen absorbed into the portal system. *Nature.* 1967 Aug;215(5102):744–745.

Carambia A, Frenzel C, Bruns OT, Schwinge D, Reimer R, Hohenberg H, Huber S, Tiegs G, Schramm C, Lohse AW, Herkel J. Inhibition of inflammatory CD4 T cell activity by murine liver sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol.* 2013 Jan;58(1):112–118.

Carambia A, Freund B, Schwinge D, Heine M, Laschtowitz A, Huber S, Wraith DC, Korn T, Schramm S, Lohse AW, Heeren J, Herkel J. TGF- β -dependent induction of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs by liver sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol.* 2014 Sep 61(3):594–599.

Carbone M, Neuberger JM. Autoimmune liver disease, autoimmunity and liver transplantation. *J Hepatol.* 2014;60(1):210–223.

Chen, CH, Seguin-DEvaux C, Burke NA, Oriss TB, Watkins SC, Clipstone N, Ray A. Transforming growth factor β blocks Tec kinase phosphorylation, Ca²⁺ influx, and NFATc translocation causing inhibition of T cell differentiation. *J Exp. Med.* 2003;197:1689–1699.

Ciccarelli O, Barkhof F, Bodini B, De Stefano N, Golay X, Nicolay K, Pelletier D, Pouwels PJW, Smith SA, Wheeler-Kingshott C A, et al. *Lancet Neurol.* 2014 Aug;13(8):807–822.

Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet.* 2002 Apr 6;359(9313):1221–1231.

Couper KN, Blount DG, de Souza JB, Suffia I, Belkaid Y, Riley EM. Incomplete depletion and rapid regeneration of Foxp3⁺ regulatory T cells following anti-CD25 treatment in malaria-infected mice. *J Immunol*. 2007 Apr;178(7):4136–4146.

Cretney E, Xin A, Shi W, Minnich M, Masson F, Miasari M, Belz GT, Smyth GK, Busslinger M, Nutt SL, Kallies A. The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2011 Apr;12(4):304–311.

Crispe, IN. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2003 Jan;3(1):51–62.

Crispe IN. The Liver as a Lymphoid Organ. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:147–163.

Crispe IN. Immune tolerance in liver disease. *Hepatology*. 2014 Jun 9. doi: 10.1002/hep.27254.

Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, *et al*. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. 2003;421:744–748.

Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Shen S, Ding Y, Yee H, Lafaille JJ. Adaptive Foxp3⁺ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. *Immunity*. 2008;29:114–126.

Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunity*. 2009 May; 30(5):626–635.

De Jong E, Suddason T, Lord GM: Translational Mini-Review Series on Th17 cells: Development of mouse and human T helper 17 cells. *Clin Exp Immunol*. 2010 Feb;159(2):148–158.

Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol*. 1993;150:353–360.

Di Marco R, Xiang M, Zaccone P, Leonardi C, Franco S, Meroni P, Nicoletti F. Concanavalin A-induced hepatitis in mice is prevented by interleukin (IL)-10 and exacerbated by endogenous IL-10 deficiency. *Autoimmunity*. 1999 Oct;31(2):75–83.

Erhardt A, Biburger M, Papadopoulos T, Tiegs G. IL-10, regulatory T cells and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver injury in mice. *Hepatology*. 2007;45:475–485.

Esposito M, Ruffini F, Bergami A, Garzetti L, Borsellino G, Battistini L, Martino G, Furlan R. IL-17- and IFN-gamma-secreting Foxp3⁺ T cells infiltrate the target tissue in experimental autoimmunity. *J Immunol*. 2010;185:7467–7473.

Fahlen L, Read S, Gorelik S, Hurst D, Coffman RL, Flavell RA, Powrie F. T cells that cannot respond to TGF- β escape control by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Exp Med*. 2005;201:737–746.

Fairchild PJ, Wildgoose R, Atherton E, Webb S, Wraith DC. An autoantigenic T cell epitope forms unstable complexes with class II MHC: a novel route for escape from tolerance induction. *Int Immunol*. 1993;5:1151–1158.

Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, Schlawe K, Chang HD, Bopp T, Schmitt E, Klein-Hessling S, Serfling E, Hamann A, Huehn J. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol*. 2007 Feb;5(2).e38.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4:330–336.

Fu S, Zhang N, Yopp AC et al. TGF- β induces Foxp3⁺ T-regulatory cells from CD4⁺ CD25⁻ precursors. *Am J Transplant*. 2004;4(10):1614–1627.

Gaffen SL. Structure and signaling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol.* 2009 Aug;9(8):556–567.

Gagliani N, Magnani CF, Huber S, Gianolini ME, Pala M, Licona-Limon P, Guo B, Herbert DR, Bulfone A, Trentini F, Di Serio C, Bacchetta R, Andreani M, Brockmann L, Gregori S, Flavell RA, Roncarolo MG. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat Med.* 2013;19(6):739–746.

Gershwin ME, Mackay IR. The causes of primary biliary cirrhosis: convenient and inconvenient truths. *Hepatology.* 2008;47:737–745.

Glimcher LH, Murphy KM: Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev.* 2000;14:1693–1711.

Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol.* 2005;174:1783–1786.

Gorelik L, Flavell RA. Abrogation of TGF- β signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity.* 2000 Feb;12(2):171–181.

Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity.* 2004;21:589–601.

Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature.* 1997;389:737–742.

Haringer B, Lozza L, Steckel B, Geginat J. Identification and characterization of IL-10/IFN- γ -producing effector-like T cells with regulatory function in human blood. *J Exp Med.* 2009;206:1009–1017.

Heneghan MA, Yeoman AD, Verma S, Smith AD, Longhi MS. Autoimmune hepatitis. *Lancet*. 2013 Oct;382(9902):1433–144.

Herkel J, Jagemann B, Wiegand C, Lazaro JF, Lueth S, Kanzler S, Blessing M, Schmitt E, Lohse AW. MHC class II-expressing hepatocytes function as antigen-presenting cells and activate specific CD4 T lymphocytes. *Hepatology*. 2003 May;37(5):1079–1085.

Hirschfield GM, Gershwin ME. The immunobiology and pathophysiology of primary biliary cirrhosis. *Annu Rev Pathol*. 2013 Jan;8:303–330.

Hirschfield GM, Karlsen TH, Lindor KD, Adams DH. Primary sclerosing cholangitis. *Lancet*. 2013 Nov;382:1587–1599.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003;299:1057–1061.

Invernizzi P. Liver auto-immunology: the paradox of autoimmunity in a tolerogenic organ. *J Autoimmun*. 2013 Oct;46:1–6.

Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RN et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol*. 1995 Jun;22(6):696–699.

Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell*. 2006;126:1121–1133.

Iwasaki Y, Fujio K, Okamura T, Yanai A, Sumimoto S, Shoda H, Tamura T, Yoshida H, Charnay P, Yamamoto K. Egr-2 transcription factor is required for Blimp-1-mediated IL-10 production in IL-27-stimulated CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol*. 2013 Apr;43(4):1063–1073.

Jäger A, Dardalhon V, Sobel RA, Bettelli E, Kuchroo VK. Th1, Th17, and Th9 effector cells

induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J Immunol.* 2009 Dec 1;183(11):7169–7177.

Jankovic D, Kullberg MC, Feng CG, Goldszmid RS, Collazo CM, Wilson M, Wynn TA, Kamanaka M, Flavell RA, Sher A. Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J Exp Med.* 2007;204:273–283.

Jin D, Zhang L, Zheng J, Zhao Y. The inflammatory Th 17 subsets in immunity against self and non-self antigens. *Autoimmunity.* 2008 Mar;41(2):154–62.

Jin JO, Han X, Yu Q. Interleukin-6 induces the generation of IL-10-producing Tr1 cells and suppresses autoimmune tissue inflammation. *J Autoimmun.* 2013 Feb;40:28–44.

Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol.* 2003;171:6323–6327.

Kamanaka M, Kim ST, Wan YY, Sutterwala FS, Lara-Tejero M, Galan JE, Harhaj E, Flavell Ra. Expression of interleukin-10 in intestinal lymphocytes detected by an interleukin-10 reporter knockin tiger mouse. *Immunity.* 2006 Dec;25(6):941–52.

Kaplan MM; Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med.* 2005;353;1261–1273.

Kim HP, Leonard WJ. CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced Foxp3 gene expression: a role for DNA methylation. *J Exp Med.* 2007;204(7):1543–551.

Kingham TP, Chaudhry UI, Plitas G, Katz SC, Raab J, DeMattheo RP. Murine liver plasmacytoid dendritic cells become potent immunostimulatory cells after Flt-3 ligand expansion. *Hepatology.* 2007;45:445–454.

Knolle PA, Limmer A. Neighborhood politics: the immunoregulatory function of organ-resident liver endothelial cells. *Trends Immunol.* 2001;22:432–437.

Knolle P, Schlaak J, Uhrig A, Kempf P, Meyer zum Büschenfelde KH, Gerken G. Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *J Hepatol.* 1995;22:226–229.

Knolle PA, Schmitt E, Jin S, Germann T, Duchmann R, Hegenbarth S, Gerken G, Lohse AW. Induction of cytokine production in naive CD4⁺ T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward T(h1) cells. *Gastroenterology.* 1999;116:1428–1440.

Knolle PA, Uhrig A, Hegenbarth S, Löser E, Schmitt E, Gerken G, et al. IL-10 downregulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells through decreased antigen uptake via the mannose receptor and lowered surface expression of accessory molecules. *Clin Exp Immunol.* 1998;114:427–433.

Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD. Cutting edge: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2002 Nov;169(9):4712–4716.

Kohm AP, McMahon JS, Podojil JR, Begolka WS, DeGutes M, Kasprovicz DJ, Ziegler SF, Miller SD: Cutting edge: anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *J Immunol.* 2006;176:3301–3305.

Korn T, Reddy J, Gao W, Bettelli E, Awasthi A, Petersen TR, Bäckström BT, Sobel RA, Wucherpfennig KW, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med.* 2007 Apr;13(4):423–431.

Kruse N, Neumann K, Schrage A, Derkow K, Schott E, Erben U, et al. Priming of CD4 + T cells by liver sinusoidal endothelial cells induces CD25^{low} forkhead box protein 3-regulatory T cells suppressing autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 2009;50:1904–1913.

Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*. 1993;75:263–274.

Lafaille JJ, Nagashima K, Katsuki M, et al. High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Cell*. 1994;78:399–408.

Lal G, Bromberg JS. Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood*. 2009 Oct;114(18):3727–35.

Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W.M, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2005;201:233–240.

Lee Y, Awasthi A, Yosef N, Quintana FJ, Xiao S, Peters A, et al. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol*, 2012;13:991–999.

Levings MK, Gregori S, TResoldi E, Cazzaniga S, Bonini C, Roncarolo MG. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25⁺CD4⁺ Tr cells. *Blood*. 2005;105(3):1162–1169.

Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F, Squadrone S, de Waal Malefyt R, Roncarolo MG. IFN- α and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J Immunol*. 2001;166:5530–5539.

Li MO, Flavell RA. TGF- β : a master of all T cell trades. *Cell*. 2008;134:392–404.

Li MO, Sanjabi Sm, Flavell RA. Transforming growth factor- β controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent

mechanisms. *Immunity*. 2006;25:455–471.

Li MO, Wan YY, Flavell RA. T-cell –produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity*. 2007;26:579–591.

Li F, Tian Z. The liver works as a school to educate regulatory immune cells. *Cell Mol Immunol*. 2013 Jul;10(4):292–302.

Liang S, et al. Conversion of CD4⁺ CD25⁻ cells into CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in vivo requires B7 costimulation, but not the thymus. *J. Exp. Med*. 2005;201:127–137.

Lin MH, Yeh LT, Chen SJ, Chiou HY, Chu CC, Yen LB, Lin KI, Chang DM, Sywtu HK. T cell-specific BLIMP-1 deficiency exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis in nonobese diabetic mice by increasing Th1 and Th17 cells. *Clin Immunol*. 2014 Apr;151(2):101–113.

Liu H, Bakthavatsalam R, Meng Z, Li Z, Li W, Perkins JD; Reyes J. PD-L1 signal on liver dendritic cells is critical for Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ Treg and liver tolerance induction in mice. *Transplant Proc*. 2013;45:1853–1855.

Liu GY, Fairchild PJ, Smith RM, Prowle JR, Kioussis D, et al. Low avidity recognition of self-antigen by T cells permits escape from central tolerance. *Immunity*. 1995;3: 407–415.

Limmer A, Sacher T, Alferink J, Kretschmar M, Schönrich G, Nichterlein T, Arnold B, Hämmerling GJ. Failure to induce organ-specific autoimmunity by breaking of tolerance: importance of the microenvironment. *Eur J Immunol*. 1998 Aug;28(8):2395–2406.

Liu GY, Fairchild PJ, Smith RM, Prowle JR, Kioussis D, et al. Low avidity recognition of self-antigen by T cells permits escape from central tolerance. *Immunity*. 1995;3:407–415.

Li MO, Flavell RA. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Immunity*. 2008 Apr;28(4):468–476.

Liu Y, Zhang P, Li Y, Kulkarni AB, Perruche P, Chen W. A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 2008;9:632–640.

Lüth S, Huber S, Schramm C, Nuch T, Zander S, Stadelmann C, Brück W, Wraith DC, Herkel J, Lohse AW. Ectopic expression of neural autoantigen in mouse liver suppresses experimental autoimmune neuroinflammation by inducing antigen-specific Tregs. *J Clin Invest.* 2008;118(10): 3403–3410.

Lohse AW, Mieli-Vergani G. Autoimmune hepatitis. *J Hepatol.* 2011 Jul;55(1);171–182.

Longencker G, Thyagarajan T, Nagineni CN, Flanders KC, Factor V, Miller G, Ward JM, Nalca A, Rangnekar VM, Thorgeirsson S, Kulkarni AB. Endocrine expression of the active form of TGF-beta1 in the TGF.beta1 null mice fails to ameliorate lethal phenotype. *Cytokine.* 2002 Apr;18(1):43–50.

Lutz M, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* 2002;23:445–449.

Magnani CF, Alberigo G, Bacchetta R, Serafini G, Andreani M, Roncarolo MG, Gregori S. Killing of myeloid APCs via HLA class I, CD2 and CD226 defines a novel mechanism of suppression by human Tr1 cells. *Eur J Immunol.* 2011 Jun;41(6):1652–1662.

Matta BM, Raimondi G, Rosborough BR, Sumpter TL, Thomson AW. IL-27 production and STAT3-dependent upregulation of B7-H1 mediate immune regulatory functions of liver plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol.* 2012 Jun;188(11):5227–5237.

Maynard CL, Harrington LE, Janowski KM, Oliver JR, Zindl CL, Rudensky AY, Weaver CT. Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nat Immunol.* 2007;8:931–941.

McGeachy MJ, Stephens LA, Anderton SM. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4⁺CD25⁺ regulatory cells within the central nervous system. *J. Immunol.* 175(2005):3025–3032.

Meiron M, Zohar Y, Anunu R, Wildbaum G, Karin N. CXCL12 (SDF-1 α) suppresses ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis by selecting antigen-specific regulatory T cells. *J Exp Med.* 2008;205:2643–2655.

Milo R, Miller A. Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2014;13:518–524.

Montero E, Nussbaum G, Kaye JF, Perez R, Lage A, Ben-Nun A, Cohen IR. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4⁺, CD25⁺ and CD8⁺ T cells: analysis using depleting antibodies. *J Autoimmun.* 2004;23:1–7.

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:683–765.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW et al. Two types of murine helper T cell clones I Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986;136:2348–2357.

Nakamura K, Kitani A, Fuss I, Pedersen A, Harada N, Nawata H, Strober W. TGF- β 1 plays an important role in the mechanisms of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol.* 2004;172:834–842.

Neumann C, Heinrich F, Neumann K, Junghans V, Mashreghi MF, Ahlers J, Janke M, Rudolph C, Mockel-Tenbrinck N, Kühl AA, Heimesaat MM, Esser C, Im SH, Radbruch A, Rutz S, Scheffold A. Role of Blimp-1 in programming Th effector cells into IL-10 producers. *J Exp Med.* 2014 Aug;211(9):1807–1819.

Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J*

Med. 2000;343:938–952.

O'Garra A, Steinman L, Gijbels K. CD4+ T-cell subsets in autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. 1997 Dec;9(6):872–883.

O'Shea JJ, Murray PJ. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity*. 2008;28:447–487.

Peres RV, Swanson C, Morgan M, Erickson K, Hubbard NE, German JB. Portal venous transfusion up-regulates Kupffer cell cyclooxygenase activity: a mechanism of immunosuppression in organ transplantation. *Transplantatio*. 1997;64:135–139.

Pollheimer MJ, Halibasic E, Fickert P, Trauner M. Pathogenesis of primary sclerosing cholangitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011 Dec;25(6):727–739.

Robinson AP, Harp CT, Noronha A, Miller SD. The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. *Handb Clin Neurol*. 2014;122:173–189.

Robinson D, Shibuya K, Mui A, et al. IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFκB. *Immunity*. 1997;7:571–581.

Rohn TA, Jennings GT, Hernandez M, Grest P, Beck M, Zou Y, Kopf M, Bachmann MF. Vaccination against IL-17 suppresses autoimmune arthritis and encephalomyelitis. *Eur J Immunol*. 2006;36:2857–2867.

Rust C, Beuers U. Overlap syndroms among autoimmune liver diseases. *World J Gastroenterol*. 2008;14:3368–3373.

Sacher T, Knolle P, Nichterlein T, Arnold B, Hämmerling GJ, Limmer A. CpG-ODN-induced inflammation is sufficient to cause T-cell-mediated autoaggression against hepatocytes. *Eur J Immunol.* 2002 Dec;32(12):3628–3637.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunology.* 1995;155(3):1151–1164.

Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol.* 2005;6:345–352.

Sanjabi S, Zenewicz LA, Kamanaka M, Flavell RA. Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr Opin Pharmacol.* 2009 Aug;9(4):447–453.

Schwandner R, Yamaguchi K, Cao Z. Requirement of tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6 in interleukin 17 signal transduction. *J Exp Med.* 2000;191:1233–1240.

Seder RA, Gazzinelli R, Sher A, et al. IL-12 acts directly on CD4⁺ T cells to enhance priming for IFN γ production and diminish IL-4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:10188–10192.

Shevach EM. TGF- β to the rescue. *Immunity.* 2010 May 28;32(5):585–587.

Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 2003;113:685–700.

Shipkova M, Wieland E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clin Chim Acta.* 2012 Sep;413(17-18):1338–1349.

Sriram S, Solomon D, Rouse V, et al. Identification of T cell subsets and B lymphocytes in

mouse brain experimental allergic encephalitis lesions. *J Immunol.* 1982;129:1649–1651.

Stephens LA, Anderton SM. Comment on “Cutting edge: anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion of CD4+CD25+ T regulatory cells”. *J Immunol.* 2006 Aug;177(4):2036.

Stockis J, Colua D, Coulie PG, Lucas S. Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF-beta on the surface of activated human Treg. *Eur J Immunol.* 2009;39:3315–3322.

Stumhofer JS, Silver JS; Laurence A, Porrett PM, Harris TH, Turka LA, Ernst M, Saris CJ, O’Shea JJ, Hunter CA. Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat Immunol.* 2007 Dec;8(12):1363–1371.

Sun Z, Wada T, Maemura K, Uchikura K, Hoshino S, Diehl AM, Klein AS. Hepatic allograft-derived Kupffer cells regulate T cell response in rats. *Liver Tranpl.* 2003;9:489–497.

Suri-Payer E, Cantor H. Differential cytokin requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4+CD25+ T cells. *J Autoimmun.* 2001;16:115–123.

Swain SL, Weinberg AD, English M, et al. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol.* 1990;145:3796–3806.

Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th 1 immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:713–758.

Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med.* 2000;192:303–310.

Tang Q, Adams JY, Tooley J, Bi M, Fife BT, Serra P, Santamaria P, Locksley RM, Krummel MF, Bluestone JA. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat Immunol.* 2006;7:83–92.

Thomson AW, Knolle PA. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:753–766.

Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, Shevach EM. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells. *Immunol.* 184:3433–3441.

Thornton AM, Shevach EM. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *Exp Med.* 1998;188:287–296.

Tiegs G, Lohse AW. Immune tolerance: What is unique about the liver. *J Autoimmun.* 2010 Feb; 34(1):1–6.

Tran DQ, Andersson J, Wang R, Ramsey H, Unutmaz D, Shevach EM. GARP (LRRC32) is essential for the expression of latent TGF-beta on platelets and activated FOXP3⁺ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:13445–13450.

Vasanthakumar A, Kallies A. IL-27 paves different roads to Tr1. *Eur J Immunol.* 2013 Apr;43(4):882–885.

Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M. & Stockinger, B. TGFβ in the context of an inflammatory cytokine milieu supports *de novo* differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* 2006;24:179–189.

Vieira PL, Christensen JR, Minaee S, O’neill EJ, Barrat FJ, Boonstra A, Barthlott T, Stockinger B, Wraith DC, O’Garra A. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol.* 2004;172:5986–5993.

Walker LS, Chodos A, Eggen M, Dooms H, Abbas AK. Antigen-dependent proliferation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in vivo. *J. Exp. Med.* 2003;198:249–258.

Wan, YY, Flavell, RA. Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005;102:5126–5131.

Wan S, LeClerc JL, Schmartz D, et al. Hepatic release of interleukin-10 during cardiopulmonary bypass in steroid-pretreated patients. *Am Heart J.* 1997;133:335–339.

Wan H, Meng R, Li Z, Yang B, Liu Y, Huang F, Zhang J, Chen H, Wu C. Il-27 induces the differentiation of Tr1-like cells from human naïve CD4⁺ T cells via the phosphorylation of STAT1 and STAT3. *Immunol Lett.* 2011 Apr;136(1):21–38.

Weinhold B, Ruther U. Interleukin-6-dependent and –independent regulation of the human C-reactive protein gene. *Biochem.* 1997;327:425–429.

Wildbaum G, Netzer N, Karin N. Tr1 cell-dependent active tolerance blunts the pathogenic effects of determinant spreading. *J Clin Invest.* 2002;110:701–710.

Willenborg DO, Fordham SA, Staykova MA, Ramshaw IA, Cowden WB. IFN-gamma is critical to the control of murine autoimmune encephalomyelitis and regulates both in the periphery and in the target tissue: a possible role for nitric oxide- *J Immunol.* 1999;163:5278–5286.

Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehevari Z, Nomura T, Sakaguchi S. CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science.* 2008;322:271–275.

Wipff PJ, Hinz B. Integrins and the activation of latent transforming growth factor beta1 – an intimate relationship. *Eur J Cell Biol.* 2008 Sep;87(8-9):601–615.

Xu L, Yin W, Sun R, Wei H, Tian Z. Liver type I regulatory T cells suppress germinal center formation in HBV-tolerant mice. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2013 Oct;110(42):16993–16998.

Yang R, Liu Q, Grosfeld JL, Pescovitz MD. Intestinal venous drainage through the liver is a prerequisite for oral tolerance induction. *J Pediatr Surg*. 1994;29:1145–1148.

Ye F, Yan S, Xu L, Jiang Z, Liu N, Xiong S, Wang Y, Chu Y. Tr1 regulatory T cells induced by ConA pretreatment prevent mice from ConA-induced hepatitis. *Immunol Lett*. 2009 Feb;122(2):198–207.

Zelenay S, Demengeot J. Comment on “Cutting edge: anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion of CD4+CD25+ T regulatory cells”. *J Immunol*. 2006 Aug; 177(4):2036.

Zhang H, Podojil JR, Luo X, et al. TGF-beta-induced myelin peptide-specific regulatory T cells mediate antigen-specific suppression of induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2010,184:6629–6636.

Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*. 1997;89:587–596.

Zhou L, Chong MM; Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity*. 2009 May;39(5):646–655.

Zhou L, Lopes JE, Chong MM, Ivanov II, Min R, Victora GD, Shen Y, Du J, Rubstov YP, Rudesnyk AY et al. TGF-β-induced Foxp3 inhibits T_H17 cell differentiation by antagonizing RORγt function. *Nature*. 2008;453:236–240.

Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ, Littman DR. IL-6 programs T(h)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol*. 2007 Sep;8(9):967–974.

10.Kongressbeitrag

32. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber - GASL, München 2015

Treg impairment is not a sufficient cause of autoimmune liver inflammation.

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

11. Publikationen

Carambia A, Freund B, Schwinge D, Heine M, Laschtowitz A, Huber S, Wraith DC, Korn T, Schramm S, Lohse AW, Heeren J, Herkel J. TGF- β -dependent induction of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs by liver sinusoidal endothelial cells. J Hepatol. 2014 Sep 61(3):594-9.

12. Danksagung

Zunächst danke ich Prof. Dr. Ansgar W. Lohse für die Möglichkeit meine Doktorarbeit innerhalb seiner Klinik anfertigen zu können.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Johannes Herkel für die außerordentlich gute Betreuung dieser Doktorarbeit, sein Vertrauen und seine Hilfsbereitschaft in allen Belangen.

Mein weiterer besonderer Dank geht an Dr. Antonella Carambia für die hervorragende Einarbeitung und Betreuung im Labor und den fachlichen Rat. Insbesondere ihren Teamgeist und Humor habe ich während dieser Zeit zu schätzen gelernt.

Ich danke auch Prof. Dr. Christoph Schramm, der durch seinen Unterricht mein Interesse am Thema geweckt hat und mich während meiner Laborzeit immer wieder fachlich beraten konnte.

Für die stetige technische Unterstützung danke ich Christina Trabant und Marko Hilken.

Weiter danke ich dem restlichen Laborteam für die vielen Ratschläge und die ständige Hilfsbereitschaft.

Schließlich danke ich meiner Familie und meinen Freunden für Ihre großartige Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

13. 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: