

# **Antigenpräsentation und Aktivierung von T-Zellen in der Leber**

## **D i s s e r t a t i o n**

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Katja Derkow

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter:     1. Prof. Dr. Alf Hamann  
                  2. PD Dr. Eckart Schott  
                  3. Prof. Dr. Wolfgang Uckert

Tag der mündlichen Prüfung: 24.08.2010



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>i</b>
<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>iii</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>iv</b>
<b>Summary</b> .....	<b>vi</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Das Immunsystem – Überblick.....	1
1.1.1 Antigenpräsentation .....	1
1.1.2 Aktivierung von T-Zellen .....	3
1.1.3 Immunologische Toleranz .....	4
1.1.4 Regulatorische T-Zellen.....	5
1.2 Das Immunsystem in der Leber .....	5
1.2.1 Funktion und Aufbau der Leber .....	5
1.2.2 Zellpopulationen in der Leber .....	6
1.2.3 Antigenpräsentation und Aktivierung von T-Zellen in der Leber.....	7
1.2.3.1 Hepatozyten.....	8
1.2.3.1.1 Antigenpräsentation und Aktivierung von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen durch Hepatozyten ...	8
1.2.3.1.2 Antigenpräsentation und Aktivierung von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen durch Hepatozyten ...	9
1.2.3.2 Cholangiozyten .....	10
1.2.3.3 Sinusoidale Leberendothelzellen .....	11
1.2.3.4 Kupffer Zellen.....	11
1.2.3.5 Dendritische Zellen.....	12
1.2.3.6 Ito-Zellen .....	13
1.2.4 Periphere Toleranzinduktion in der Leber .....	13
1.3 Autoimmune Lebererkrankungen .....	14
1.3.1 Überblick.....	14
1.3.2 Autoimmune Hepatitis .....	15
1.3.3 Primär sklerosierende Cholangitis .....	15
1.4 Tiermodelle für autoimmune Lebererkrankungen .....	16
1.4.1 Tiermodelle der AIH .....	16
1.4.2 Tiermodelle der PSC .....	18
1.5 Generierung von ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen.....	18
<b>2 Zielsetzung</b> .....	<b>20</b>
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>21</b>
3.1 Material.....	21
3.1.1 Geräte .....	21
3.1.2 Sonstige Materialien und Verbrauchsmaterialien .....	21

3.1.3	Chemikalien/Reagenzien .....	22
3.1.4	Enzyme und rekombinante Proteine .....	24
3.1.5	Größenstandards .....	24
3.1.6	Vorgefertigte Systeme (Kits).....	24
3.1.7	Medien .....	24
3.1.8	Puffer und Lösungen .....	24
3.1.9	Synthetische Oligonukleotide.....	25
3.1.10	Antikörper.....	26
3.1.11	Versuchstiere .....	27
3.2	Methoden.....	28
3.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	28
3.2.1.1	RNA-Extraktion.....	28
3.2.1.2	Konzentrationsbestimmung von RNA .....	28
3.2.1.3	DNase Verdau.....	28
3.2.1.4	Reverse Transkription (RT-PCR).....	29
3.2.1.5	Isolation von genomischer DNA aus Schwanzspitzenbiopsien.....	29
3.2.1.6	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	29
3.2.1.7	Agarosegelelektrophorese .....	30
3.2.2	Proteinbiochemische Methoden .....	30
3.2.2.1	Herstellung von Proteinlysaten .....	30
3.2.2.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	30
3.2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot.....	31
3.2.3	Tierexperimentelle Methoden.....	31
3.2.3.1	Isolation von Zellen aus Mausgewebe .....	31
3.2.3.1.1	Isolation von Zellen aus der Milz .....	32
3.2.3.1.2	Isolation von Zellen aus den Lymphknoten.....	32
3.2.3.1.3	Isolation von intrahepatischen Lymphozyten .....	32
3.2.3.1.4	Isolation von Zellen aus peripherem Blut.....	32
3.2.3.1.5	Isolation von Zellpopulationen durch magnetische Zellseparation.....	33
3.2.3.2	Bestimmung der Zellzahl .....	33
3.2.3.3	Adoptiver Transfer von Zellen.....	34
3.2.3.4	Herstellung von Knochenmarkchimären.....	34
3.2.3.5	Splenektomie.....	34
3.2.3.5.1	Hemmung der Migration.....	34
3.2.3.6	Depletion Foxp3 <sup>+</sup> GFP <sup>+</sup> Zellen in TF-OVAXDEREG Mäusen .....	35
3.2.3.7	<i>In vivo</i> Zytolyse Assay .....	35
3.2.4	<i>In vitro</i> Polarisierung von CD4 <sup>+</sup> Effektorzellen.....	36



3.2.5	T-Zell-Restimulation.....	36
3.2.6	Durchflusszytometrie und Färbung von Zellen.....	37
3.2.6.1	Durchflusszytometrie und Auswertung.....	37
3.2.6.2	Färbung von Oberflächenantigenen.....	37
3.2.6.3	Färbung von intrazellulären Antigenen.....	37
3.2.6.4	CFSE-Markierung von Zellen.....	38
3.2.7	Bestimmung von Alaninaminotransferase und Bilirubin im Plasma.....	38
3.2.8	Immunhistochemische Methoden.....	39
3.2.8.1	Herstellung von Gewebeschnitten.....	39
3.2.8.2	Entparaffinieren von Paraffinschnitten.....	39
3.2.8.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E).....	40
3.2.8.4	Immunhistochemie und Immunfluoreszenz.....	40
3.2.8.5	TUNEL-Färbung.....	40
3.2.9	Statistische Auswertung.....	41
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>42</b>
4.1	Leberspezifische Expression von Ovalbumin in ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen.....	42
4.2	Präsentation von hepatischen Antigenen und Aktivierung von OT-I CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....	43
4.2.1	Antigenabhängige Migration von OT-I CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen.....	43
4.2.2	Proliferation von OT-I CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen.....	44
4.2.3	Induktion von Entzündung durch den Transfer von OT-I CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....	47
4.2.3.1	Akkumulation von CD8 <sup>+</sup> Vα2 <sup>+</sup> Zellen in der Leber von ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen.....	47
4.2.3.2	Induktion einer transienten Hepatitis durch OT-I CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in TF-OVA Mäusen.....	49
4.2.3.3	In der Leber aktivierte OT-I CD8 <sup>+</sup> T-Zellen erlangen Effektorfunktion.....	50
4.2.4	Die Aktivierung von OT-I CD8 <sup>+</sup> T-Zellen erfolgt in der Leber unabhängig von Milz und Lymphknoten.....	53
4.2.5	Knochenmarkabhängige antigenpräsentierende Zellen sind notwendig zur vollständigen Aktivierung von OT-I CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in der Leber.....	55
4.2.5.1	Proliferation von OT-I CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in β2m <sup>-/-</sup> →ASBT-OVA und β2m <sup>-/-</sup> →TF-OVA Chimären.....	56
4.2.5.2	Unvollständige Aktivierung von OT-I CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in β2m <sup>-/-</sup> →ASBT-OVA und β2m <sup>-/-</sup> →TF-OVA Chimären.....	57
4.2.6	Apoptose der OT-I CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in der Leber.....	59
4.2.7	Die Rolle endogener CD4 <sup>+</sup> T-Zellen bei der durch OT-I CD8 <sup>+</sup> T-Zellen induzierten Hepatitis in TF-OVA Mäusen.....	60

4.2.7.1	Akkumulation von CD4 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> Zellen in der Leber von TF-OVA Mäusen .....	60
4.2.7.2	Depletion der Foxp3 <sup>+</sup> Zellen führt zur unkontrollierten Ausbreitung der OT-I CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in TF-OVAxDEREG Mäusen und zur Verstärkung der Hepatitis .....	61
4.3	Präsentation von hepatischen Antigenen und Aktivierung von OT-II CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	63
4.3.1	Proliferation von OT-II CD4 <sup>+</sup> T -Zellen in ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen .....	63
4.3.2	Präsentation von Ovalbumin für OT-II CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in der Leber im entzündlichen Kontext .....	65
4.3.3	Phänotyp der in TF-OVA Mäusen aktivierten OT-II CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	66
4.3.4	OT-II CD4 <sup>+</sup> T-Zellen verstärken nicht die durch CD8 <sup>+</sup> T-Zellen induzierte Hepatitis in TF-OVA Mäusen .....	67
4.4	Präsentation des hepatischen Antigens und Aktivierung von Effektor OT-II CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	69
4.4.1	Migration von Effektor OT-II CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in TF-OVA und C57Bl/6 Mäusen .....	69
4.4.2	Effektor OT-II CD4 <sup>+</sup> T-Zellen proliferieren in der Leber von TF-OVA Mäusen .....	70
4.4.3	Effektor OT-II CD4 <sup>+</sup> T-Zellen verstärken die durch CD8 <sup>+</sup> T-Zellen induzierte Hepatitis in TF-OVA Mäusen .....	71
4.5	Histologische Charakterisierung des entzündlichen Infiltrats .....	73
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>75</b>
5.1	Expression von Ovalbumin in Cholangiozyten und Hepatozyten .....	75
5.2	Aktivierung von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen durch hepatisches Antigen .....	76
5.3	Regulation der durch CD8 <sup>+</sup> T-Zellen induzierten Hepatitis .....	82
5.4	Aktivierung von OT-II CD4 <sup>+</sup> T-Zellen und Einfluss des hepatischen Antigens auf Effektor OT-II CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	85
5.5	Die Auswirkung des Kotransfers von OT-II CD4 <sup>+</sup> T-Zellen und Effektor OT-II CD4 <sup>+</sup> T-Zellen mit OT-I CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	88
5.6	Histologische Charakterisierung des Infiltrats .....	90
5.7	Schlussfolgerung und Ausblick .....	91
<b>6</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>93</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>111</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>112</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>112</b>
	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>113</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>114</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIH	Autoimmune Hepatitis
ALT	Alaninaminotransferase
APC	Allophycocyanin
APZ	antigenpräsentierende Zelle
ASBT	Apikaler Natrium-abhängiger Gallensalztransporter ( <i>engl.</i> : Apical sodium dependent bile transporter)
BiliT	Bilirubin, total
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>engl.</i> : bovine serumalbumin)
CD	Differenzierungsmarker ( <i>engl.</i> : cluster of differentiation)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFSE	Carboxyfluorescein-succinimidyl-ester
DAPI	Diaminophenylindol
DC	Dendritische Zelle ( <i>engl.</i> : Dendritic cell)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotide
DT	Diphtherie Toxin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung ( <i>engl.</i> : fluorescence activated cell sorting)
FCS	Fötales Kälberserum ( <i>engl.</i> : fetal calf serum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Foxp3	Forkhead box protein 3
FSC	Vorwärtsstreulicht ( <i>engl.</i> : forward scatter)
g	Gramm
GFP	Grünfluoreszierendes Protein ( <i>engl.</i> : green fluorescent protein)
h	Stunde(n) ( <i>engl.</i> : hour)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IHL	intrahepatische Lymphozyten
IL	Interleukin
IM	Ionomycin
ing LK	inguinaler Lymphknoten
i.p.	intraperitoneal

---

i.v.	intravenös
Kb	Kilo Basenpaare
KC	Kupffer Zelle ( <i>engl.</i> : Kupffer cell)
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramm
LSEC	Lebersinusoidale Endothelzelle ( <i>engl.</i> : liver sinusoidal endothelial cell)
MACS	Magnetische Zellsortierung ( <i>engl.</i> : magnetic cell sorting)
mes LK	mesenterialer Lymphknoten
mg	Miligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>engl.</i> : major histocompatibility complex)
min	Minute(n)
NK-	natürliche Killer-
ns	nicht signifikant
OD	Optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>engl.</i> : polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidium Iodid
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PSC	Primär Sklerosierende Cholangitis
rel.	relative
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler ( <i>engl.</i> : standard error of mean)
SSC	Seitwärtsstreulicht ( <i>engl.</i> : sideward scatter)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat EDTA
TF	Transferrin
Treg	Regulatorische T-Zelle(n)
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TZR	T-Zellrezeptor

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Antigenprozessierung und Antigenpräsentation. ....	3
Abb. 2: Schematische Darstellung der Zellpopulationen in der Leber. ....	7
Abb. 3: Schematische Darstellung der DNA-Konstrukte, die zur Generierung der Stämme ASBT-OVA und TF-OVA verwendet wurden. ....	19
Abb. 4: Leberspezifische Expression von Ovalbumin in ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen. ....	43
Abb. 5: Migration von OT-I CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen. ....	44
Abb. 6: Proliferation von OT-I CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen. ....	46
Abb. 7: Akkumulation von CD8 <sup>+</sup> Vα2 <sup>+</sup> Zellen und differentielles Infiltrat in der Leber von ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen. ....	48
Abb. 8: OT-I CD8 <sup>+</sup> T-Zellen induzieren eine transiente Leberentzündung. ....	50
Abb. 9: Effektorfunktion der in ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen aktivierten OT-I CD8 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	52
Abb. 10: Die Aktivierung von OT-I CD8 <sup>+</sup> T-Zellen erfolgt unabhängig von Milz und Lymphknoten. ....	55
Abb. 11: Proliferation von OT-I CD8 T Zellen in β2m <sup>-/-</sup> →ASBT-OVA und β2m <sup>-/-</sup> →TF-OVA Chimären. ....	57
Abb. 12: Unvollständige Effektorfunktion von OT-I CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in β2m <sup>-/-</sup> →ASBT-OVA und β2m <sup>-/-</sup> →TF-OVA Chimären. ....	58
Abb. 13: Apoptose. ....	60
Abb. 14: Regulatorische T-Zellen akkumulieren in der Leber von TF-OVA Mäusen während der durch CD8 <sup>+</sup> T-Zellen induzierten Hepatitis. ....	61
Abb. 15: Foxp3 <sup>+</sup> Zellen regulieren die durch CD8 <sup>+</sup> T-Zellen induzierte Hepatitis. ....	62
Abb. 16: Proliferation von OT-II CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen. ....	64
Abb. 17: Präsentation von Ovalbumin für OT-II CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in der Leber im entzündlichen Kontext. ....	66
Abb. 18: Phänotyp der in TF-OVA Mäusen aktivierten OT-II CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	67
Abb. 19: OT-II CD4 <sup>+</sup> T-Zellen verstärken nicht die durch CD8 <sup>+</sup> T-Zellen induzierte Hepatitis. ....	69
Abb. 20: Migration von Effektor OT-II CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in TF-OVA und C57Bl/6 Mäusen. ....	70
Abb. 21: Proliferation von Effektor OT-II CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in TF-OVA Mäusen. ....	71
Abb. 22: Effektor OT-II CD4 <sup>+</sup> T-Zellen verstärken die durch CD8 <sup>+</sup> T-Zellen induzierte Hepatitis. ....	73
Abb. 23: Histologische Charakterisierung des entzündlichen Infiltrats. ....	74
Tab. 1: Oligonukleotide. ....	25
Tab. 2: Antikörper für Durchflusszytometrie. ....	26
Tab. 3: Antikörper zur Depletion. ....	26
Tab. 4: Antikörper für Western Blot. ....	26
Tab. 5: Antikörper für Immunhistochemie/Immunfluoreszenz. ....	27
Tab. 6: Mausstämme. ....	27

## Zusammenfassung

Die Ätiologie und Pathogenese autoimmuner Lebererkrankungen, bei denen das Immunsystem körpereigene hepatische Strukturen attackiert, sind nur unvollständig verstanden. Cholangiozyten der größeren Gallengänge sind bei der primär sklerosierenden Cholangitis (PSC) und Hepatozyten sind bei der autoimmunen Hepatitis (AIH) die Zielzellen der Autoimmunreaktion in der Leber. Über die immunologischen Vorgänge, die zur Entstehung von PSC und AIH führen, ist noch wenig bekannt, da klinische Symptome erst während fortgeschrittener Erkrankung auftreten. Somit ist es schwierig, frühe Krankheitsstadien und erste Ereignisse bei der Entstehung zu untersuchen. Mausmodelle sind zur Analyse initialer pathophysiologischer Prozesse notwendig und tragen zum besseren Verständnis der immunologischen Vorgänge in der Leber bei.

Mit Hilfe transgener Mauslinien, die das Modellantigen Ovalbumin gewebespezifisch in den Cholangiozyten der größeren Gallengänge (ASBT-OVA) oder in den Hepatozyten (TF-OVA) exprimieren, sowie adoptiven Transfers antigenspezifischer T-Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen zur Antigenpräsentation, T-Zell-Aktivierung und Toleranzinduktion in der Leber durchgeführt.

Die Expression von Ovalbumin in Cholangiozyten resultierte in einer Aktivierung adoptiv transferierter antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber sowie über Kreuzpräsentation durch hämatopoetische Zellen in der Leber und den Lymphknoten. Im Gegensatz dazu ignorierten naive antigenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen das von Cholangiozyten exprimierte Antigen und wurden nicht aktiviert.

Die Präsentation und Aktivierung antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch das in Hepatozyten exprimierte Ovalbumin erfolgte überwiegend in der Leber. Antigenspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden unter nicht-inflammatorischen Bedingungen über Kreuzpräsentation durch professionelle antigenpräsentierende Zellen (APZ) in der Leber vollständig zu Effektorzellen aktiviert. Sie waren notwendig, um autoimmune Prozesse in der Leber auszulösen und zur Schädigung des Organs zu führen. Diese Aktivierung war transient und selbst-limitiert.

Dagegen benötigten naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Aktivierung durch professionelle APZ in einem anderen Organ (Milz oder Lymphknoten), bevor sie in die Leber relokalisieren. *In vitro* polarisierte Effektor CD4<sup>+</sup> T-Zellen hingegen waren in der Lage, direkt in die Leber einzuwandern. Beide Zellpopulationen für sich allein verursachten keine Leberschädigung. CD4<sup>+</sup> T-Zellen leisteten als naive Zellen nur eine geringe Hilfe. Wenn sie durch Präaktivierung mit Th1-Eigenschaften versehen wurden, unterstützen sie jedoch die Effektorfunktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Diese Daten deuten darauf hin, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen weniger anfällig als CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind, unter nicht-inflammatorischen Bedingungen durch ein von Hepatozyten exprimiertes Antigen aktiviert zu werden und Autoimmunität auszulösen. Vielmehr spielen sie im Rahmen der Induktion von CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen in der Leber eine entscheidende Rolle bei der Limitierung der induzierten Autoimmunität und bei der Kontrolle der Expansion antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

Beide Modelle repräsentieren nicht die chronische Eigenschaft humaner autoimmuner Lebererkrankungen, aber sie ermöglichen Untersuchungen zum besseren Verständnis der Rolle verschiedener T-Zell-Populationen in der Pathogenese autoimmuner Lebererkrankungen sowie der Antigenpräsentation und Aktivierung von T-Zellen durch hepatisches Antigen.

Schlagwörter: Leber, Antigenpräsentation, CD8<sup>+</sup> T-Zellen, CD4<sup>+</sup> T-Zellen

## Summary

Aetiology and pathogenesis of autoimmune liver diseases, in which the immune system is attacking hepatic self-structures, are still incompletely understood. Cholangiocytes of the larger bile ducts and hepatocytes are the target structures of autoimmune reaction in the liver in primary sclerosing cholangitis (PSC) and autoimmune hepatitis (AIH), respectively. Little is known about the immunological processes leading to the onset of PSC and AIH, since clinical symptoms do not emerge until disease is advanced. Hence it is difficult to investigate early disease stages and primary events in its development. Mouse models are necessary to analyse initial pathophysiological processes and contribute to a better understanding of immunological processes in the liver.

With the help of transgenic mouse strains, in which the model antigen ovalbumin is expressed tissue specifically in the cholangiocytes of the larger bile ducts (ASBT-OVA) or in hepatocytes (TF-OVA), as well as the adoptive transfer of antigen specific T cells, antigen presentation, T cell activation and tolerance induction in the liver, were analyzed.

Expression of ovalbumin in cholangiocytes resulted in activation of adoptively transferred antigen specific CD8<sup>+</sup> T cells in the liver, as well as in crosspresentation by hematopoietic cells in liver and lymph nodes. In contrary, naïve antigen specific CD4<sup>+</sup> T cells ignored the antigen expressed by cholangiocytes and were not activated.

Activation of antigen specific CD8<sup>+</sup> T cells by ovalbumin expressed in hepatocytes occurred predominantly in the liver. Under non-inflammatory conditions, antigen specific CD8<sup>+</sup> T cells were fully activated to become effector cells by crosspresentation depending on professional antigen presenting cells (APCs) in the liver. They were necessary to trigger autoimmune processes in the liver leading to organ damage. This activation was transient and self-limiting.

By contrast, naïve CD4<sup>+</sup> T cells required activation by professional APCs in a different organ (spleen or lymph nodes), before relocating to the liver. However, *in vitro* polarized effector CD4<sup>+</sup> T cells had the ability to directly infiltrate into the liver. Both cell populations on their own did not elicit liver damage. CD4<sup>+</sup> T cells provided minor help when naïve, but were able to distinctively support CD8<sup>+</sup> T-cell effector function, when equipped with Th1 qualities after preactivation. These data indicate that CD4<sup>+</sup> T cells are less susceptible to activation by hepatocyte-derived antigen and induction of autoimmunity under non-inflammatory conditions than CD8<sup>+</sup> T cells. Rather, they play a crucial role in limiting autoimmunity and controlling the expansion of antigen specific CD8<sup>+</sup> T cells through induction of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in the liver.

Both models do not represent the chronic characteristics of human autoimmune liver diseases, but help to gain a better understanding regarding the role of specific T cell populations in the pathogenesis of autoimmune liver diseases, as well as regarding antigen presentation and activation of T cells by hepatic antigen.

Keywords: liver, antigen presentation, CD8<sup>+</sup> T cells, CD4<sup>+</sup> T cells



# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem – Überblick

Die Aufgaben des Immunsystems bestehen in der Abwehr von intra- und extrazellulären Krankheitserregern und der Elimination abgestorbener und maligner Zellen. Dabei wird zwischen dem angeborenen (unspezifischen) und adaptiven (erworbenen) Immunsystem unterschieden. Beide Teile sind nicht als streng voneinander getrennt aufzufassen, da ihre Komponenten miteinander interagieren müssen, um eine effektive Immunabwehr zu gestalten (Hoebe, et al., 2004; Medzhitov, 2001).

Das angeborene Immunsystem stellt eine schnelle, unspezifische Abwehr gegen Pathogene dar. Es besteht aus mechanischen Barrieren (Epithelien und deren Sekrete) sowie löslichen (z.B. Komplementsystem, Akut-Phase-Proteine, antibiotische Peptide) und zellulären (Phagozyten, Natürliche Killer-Zellen, Dendritische Zellen) Komponenten (Levy, 2007). Deren Rezeptoren (Pattern Recognition Rezeptoren, PRR) sind nicht spezifisch für ein bestimmtes Pathogen, sondern reagieren mit konservierten molekularen Mustern (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs). Die Hauptmechanismen der angeborenen Immunabwehr sind die Phagozytose von Pathogenen und die Antigenpräsentation gegenüber Zellen des adaptiven Immunsystems (Brown, 2006; Medzhitov, 2001). Das adaptive Immunsystem ist charakterisiert durch Antigenspezifität, Rezeptordiversität und -variabilität, Selbstregulation und Autotoleranz sowie die Ausbildung eines langlebigen immunologischen Gedächtnisses. Zu den Effektorzellen des adaptiven Immunsystems gehören B- und T-Lymphozyten (Jameson, 2002; Nemazee, 2006).

T-Zellen können entweder direkt zytotoxisch aktiv sein oder durch Zytokinsekretion andere Immunzellen beeinflussen. Der Antigenrezeptor der T-Lymphozyten, der T-Zellrezeptor (TZR), erkennt Antigen nur im Kontext mit Molekülen des „Major Histocompatibility Complex“ (MHC). Als MHC wird beim Menschen ein Bereich auf Chromosom 6 bezeichnet, welcher unter anderem für die Human-Leukocyte-Antigene (HLA)-Moleküle kodiert (Horton, et al., 2004). Diese Zelloberflächenmoleküle sind die verantwortlichen Antigene bei der Verträglichkeit und Abstoßung von Organtransplantaten und zeichnen sich durch Vielfalt, Polymorphismen und somit hohe individuelle Variabilität aus (Benichou, et al., 1992; Horton, et al., 2004). Ihre hauptsächliche physiologische Funktion besteht jedoch in der Bindung von Peptiden und deren Präsentation für T-Zellen. Man unterscheidet MHC-Klasse-I (MHC-I) und MHC-Klasse-II (MHC-II) sowie die nichtklassischen MHC-I Moleküle und MHC-ähnliche Moleküle (z.B. CD1) (Brigl and Brenner, 2004; Horton, et al., 2004).

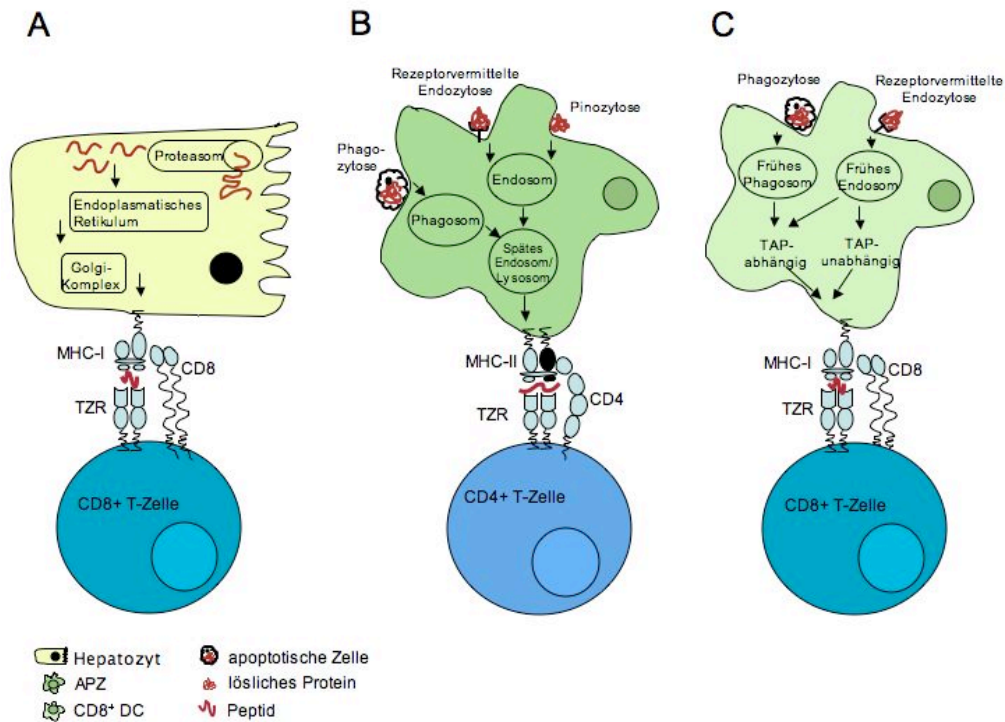
### 1.1.1 Antigenpräsentation

MHC-I Moleküle werden auf fast allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert. Durch den räumlichen Aufbau ihrer Domänen bildet sich an der Oberfläche der MHC-I Moleküle eine Bindungsgrube für

Peptide. Diese werden durch das Proteasom aus intrazellulären zytosolischen Proteinen generiert und im endoplasmatischen Retikulum auf die MHC-I Moleküle geladen (Abb. 1A) (Scholz and Tampe, 2009). Die Präsentation über das MHC-I Molekül dient der Markierung der Zelle als „Selbst“. Der MHC-I/Antigen-Komplex wird von T-Zellen erkannt, die den Korezeptor CD8 exprimieren (CD8<sup>+</sup> T-Zellen) (Morrison, et al., 1986).

Die konstitutive Expression von MHC-II Molekülen ist unter physiologischen Bedingungen auf Thymusepithelzellen und professionelle antigenpräsentierende Zellen (APZ) beschränkt, kann aber in den meisten Zelltypen induziert werden (Steimle, et al., 1994). Zu den APZ gehören u.a. Dendritische Zellen (DC, Dendritic cells), Makrophagen und B-Lymphozyten. Die Untereinheiten der MHC-II Moleküle bilden eine Bindungstasche für Peptide, die von extrazellulären durch Phago-, Pino- oder Endozytose aufgenommenen Proteinen stammen. Die Beladung der MHC-II Moleküle erfolgt im späten Endosom (Abb. 1B) (Burgdorf and Kurts, 2008; Watts, 2004). Der MHC-II/Antigen-Komplex aktiviert T-Zellen, die zusätzlich zum TZR-Komplex den Korezeptor CD4 exprimieren (CD4<sup>+</sup> T-Zellen) (Morrison, et al., 1986).

Die strikte Trennung dahingehend, dass intrazelluläre Antigene von MHC-I und exogene Antigene von MHC-II präsentiert werden, ist jedoch nicht immer zutreffend. Über einen als Kreuzpräsentation bezeichneten Mechanismus können CD8<sup>+</sup> DC, Langerhans-Zellen, B-Zellen sowie knochenmarkabhängige DC, Makrophagen und sinusoidale Leberendothelzellen (LSEC, liver sinusoidal endothelial cells) exogene, durch Phagozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose internalisierte partikuläre bzw. lösliche Antigene aus dem MHC-II-Weg ausschleusen und auf MHC-I Molekülen präsentieren oder direkt in den MHC-I-Weg einbringen (Abb. 1C). Die Prozessierung des Antigens kann TAP (transporter associated with antigen processing) -abhängig und TAP-unabhängig erfolgen (Burgdorf and Kurts, 2008; Kurts, et al., 1996). Dabei ist noch nicht geklärt, ob die Beladung im Endosom oder dem endoplasmatischen Retikulum erfolgt. Kreuzpräsentation ist vermutlich an der Bekämpfung viraler Infektionen beteiligt, bei denen DC nicht selbst infiziert sind sowie bei der Immunantwort gegen Tumorantigene und der Induktion peripherer Kreuztoleranz (Kurts, 2000; Schildknecht, et al., 2009; Vezys and Lefrancois, 2002). Eine Rolle wird auch hinsichtlich der Entstehung von Autoimmunerkrankungen diskutiert. In Tiermodellen konnte durch Kreuzpräsentation in Anwesenheit antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen und mit Hilfe antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen Autoimmunität ausgelöst werden, die zu organspezifischen Krankheitsbildern führte (Kurts, et al., 1997; Zehn and Bevan, 2006). Nicht alle Antigene können effektiv kreuzpräsentiert werden, und es muss eine Mindestmenge an Antigen vorhanden sein, um effektiv kreuzpräsentiert zu werden (Heath and Carbone, 2001; Kurts, et al., 1998)



**Abb. 1: Schematische Darstellung der Antigenprozessierung und Antigenpräsentation.**

Zytosolische Proteine werden über MHC-I/Antigen-Komplex vom TZR  $CD8^+$  T-Zellen erkannt (A). Extrazelluläre Antigene werden über MHC-II/Antigen-Komplex vom TZR  $CD4^+$  T-Zellen erkannt (B). Lösliche durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommene Antigene sowie phagozytierte Partikel können durch Kreuzpräsentation auf MHC-I Moleküle beladen werden (C). TZR: T-Zell-Rezeptor, TAP: transporter associated with antigen processing. Abbildung nach (Burgdorf and Kurts, 2008; Kurts, 2000; Rieber, 2001).

### 1.1.2 Aktivierung von T-Zellen

Die Interaktion zwischen MHC/Antigen-Komplex und TZR stellt das erste Signal bei der Aktivierung naiver  $CD4^+$  oder  $CD8^+$  T-Zellen dar. Zusätzlich werden zur vollständigen Aktivierung weitere kostimulatorische Signale benötigt, welche von den APZ durch Membranmoleküle (CD80/CD86, ICOS-L) sowie Adhäsionsmoleküle (CD54, CD102, CD106) bereitgestellt werden (Janeway, 1992; Liu, et al., 1992; Smith-Garvin, et al., 2009).

$CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen zeichnen sich durch unterschiedliche Effektorfunktionen aus. Zu zytotoxischen Effektorzellen differenzierte  $CD8^+$  T-Zellen können nach Erkennung des MHC-I/Antigen-Komplexes von jeder Zielzelle ohne weitere kostimulatorische Signale aktiviert werden. Sie setzen die zelltoxischen Moleküle Perforin und Granzym frei und ligieren Fas auf der Zielzelle mit dem Fas-Liganden (FasL) (Chavez-Galan, et al., 2009; Kuppers and Henney, 1977; Suda, et al., 1993). Die Differenzierung von  $CD4^+$  T-Zellen in verschiedene Subpopulationen ist abhängig von den Bedingungen, unter denen die Aktivierung erfolgt. Einfluss nehmen die Stärke der Stimulation, die Art der APZ (Croft, et al., 1992), die Dichte des Antigens auf den APZ (Constant and Bottomly, 1997; Rotherhoft, et al., 2003), die Expression von Notch-Liganden (Amsen, et al., 2004), die beteiligten Toll-like Rezeptoren (TLR) (Kapsenberg, 2003) und das Zytokinmilieu (Mosmann and Coffman, 1989). Durch Aktivierung mit DC, die den Notch-Liganden Delta und eine hohe Antigenkonzentration exprimieren,

sowie unter dem Einfluss von Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Interleukin-12 (IL-12) entstehen T-Helferzellen 1 (Th1). Diese produzieren IFN- $\gamma$  und Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und vermitteln eine zelluläre Immunantwort. Th2-Zellen entstehen durch Aktivierung mit DC, die den Notch-Liganden Jagged exprimieren und eine geringe Antigenlast aufweisen, sowie unter dem Einfluss von IL-4. Sie vermitteln humorale und allergische Immunantwort durch die Produktion von IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 (Amsen, et al., 2004; de Jong, et al., 2005; Mosmann and Coffman, 1989; Rothoefl, et al., 2003). Eine weitere CD4 Effektorpopulation sind die Th17-Zellen. Sie entstehen durch Aktivierung ihres TZR in der Anwesenheit von Transforming-Growth-Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und IL-6 und sind durch die Produktion von IL-17, IL-21 und IL-22 charakterisiert. Sie sind an der Beseitigung extrazellulärer Bakterien und Pilze beteiligt, kommen aber auch bei chronischen Entzündungen vor und gelten als Vermittler autoimmuner Erkrankungen (Bettelli, et al., 2008).

### 1.1.3 Immunologische Toleranz

Aufgrund der hohen Diversität und zufälligen Spezifität der B- und T-Zellrezeptoren muss bei deren Entwicklung die Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen und harmlosen Umweltstoffen gewährleistet werden. Dies wird durch Mechanismen der zentralen und peripheren Toleranzinduktion erreicht.

Bei der zentralen Toleranz findet während der Reifung von T-Lymphozyten und der Generierung der T-Zell-Rezeptoren im Thymus eine Kombination aus positiven und negativen Selektionsmechanismen statt (Sebzda, et al., 1999). Bei der Positivselektion erhalten nur Zellen ein positives Wachstumssignal, deren TZR die autologen MHC-Moleküle binden können (Alam, et al., 1996; Hogquist, et al., 1994). Bei der Negativselektion werden Zellen deletiert, die mit zu hoher Affinität den Komplex aus autologem MHC und endogenem Peptid binden. Es können also nur solche Zellen in die Peripherie gelangen, die zwar mit MHC reagieren können, aber nicht in der Lage sind, mit einer zu hohen Affinität an den MHC/Antigen-Komplex zu binden (Sebzda, et al., 1999).

Da die Deletion autoreaktiver Zellen im Thymus nicht vollständig ist und auch die Immunantwort gegen harmlose Umweltantigene und probiotische Bestandteile unterdrückt werden muss, gibt es in der Peripherie weitere Toleranzmechanismen. Periphere Tolerisierung kann durch T-Zell-intrinsische Mechanismen, wie klonale Deletion (Rocha and Vonboehmer, 1991; Webb, et al., 1990; Zhang, et al., 1992), Antigenignoranz (Kurts, et al., 1998; Kurts, et al., 1999), Anergie (Jenkins, et al., 1990; Rammensee, et al., 1989), oder T-Zell-extrinsische Mechanismen, wie tolerisierende DC („Kreuztoleranz“) (Kurts, 2000; Kurts, et al., 1997; Luckashenak, et al., 2008) und regulatorische T-Zellen (Sakaguchi, 2004), erfolgen.

### 1.1.4 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen (Treg) spielen eine Rolle bei der Entstehung der peripheren Toleranz gegen Autoantigene und der Immunhomeostase, der Inhibierung von Antitumorimmunität und der mangelhaften Beseitigung chronischer Infektionen (de Lafaille and Lafaille, 2009). Charakteristisch für Treg ist die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 (Forkhead box P3), welcher essentiell für die Entwicklung und die regulatorischen Eigenschaften von Treg ist (Fontenot, et al., 2003; Hori, et al., 2003). Sie werden in natürliche und induzierte Treg unterteilt. Die natürlich vorkommenden Treg (nTreg) entstehen postnatal im Thymus (Itoh, et al., 1999; Nishizuk.Y and Sakakura, 1969). Die Hauptrolle der nTreg besteht in der Aufrechterhaltung immunologischer Toleranz und der Verhinderung einer überschießenden Immunantwort (de Lafaille and Lafaille, 2009). Induzierte Treg (iTreg) entstehen in der Peripherie. Aus naiven  $CD4^+Foxp3^-$  T-Zellen entwickeln sich durch suboptimale TZR-Stimulation und in Anwesenheit von IL-2 und TGF- $\beta$  (Chen, et al., 2003; Zheng, et al., 2007) oder TGF- $\beta$  und Retinolsäure (Coombes, et al., 2007; Sun, et al., 2007)  $CD4^+Foxp3^+$  T-Zellen. Ihnen wird eine Rolle in der mukosalen Immuntoleranz gegen Nahrungs- und Umweltantigene, Antigene kommensaler Bakterien sowie bei der Kontrolle chronischer allergischer Entzündung zugesprochen (de Lafaille and Lafaille, 2009).

Zumindest *in vitro* sind Treg als anerg und hypoproliferativ charakterisiert. Sie benötigen die antigenspezifische Aktivierung ihres TZR. Aber einmal aktiviert, können sie die Proliferation von  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen antigenunspezifisch supprimieren (Shevach, 2009). Sowohl nTreg als auch iTreg können entweder direkt T-Zellen inhibieren oder durch Modulation der APZ deren Funktion vermindern und somit die Aktivierung der T-Zellen indirekt blockieren. Es konnten verschiedene potentielle Wirkungsweisen der direkten und indirekten T-Zell-Suppression *in vitro* nachgewiesen werden. Treg inhibieren z.B. über die Produktion antiinflammatorischer Zytokine, den Verbrauch von IL-2, Granzym sowie sezernierte oder inhibitorische Oberflächenmoleküle (z.B. Galektin-1 und CTLA-4). Es ist jedoch noch unklar, ob diese Prozesse auch *in vivo* aktiv sind (Shevach, 2009).

Zusätzlich zu den  $Foxp3^+$  iTreg gibt es zwei weitere  $CD4^+Foxp3^-$  Zellpopulationen mit regulatorischen Eigenschaften, die Tr1- und Th3-Zellen. Tr1-Zellen sind charakterisiert durch die Produktion von IL-10 (Groux, et al., 1997), Th3-Zellen durch die Produktion von TGF- $\beta$  (Saurer and Mueller, 2009). Ihre supprimierende Wirkung ist nicht an Zell-Zellkontakte gebunden, sondern abhängig von freigesetzten Zytokinen (Saurer and Mueller, 2009).

## 1.2 Das Immunsystem in der Leber

### 1.2.1 Funktion und Aufbau der Leber

Die Leber ist das metabolische Hauptorgan für den gesamten Organismus und u.a. verantwortlich für die Energieversorgung (Aminosäure- und Glucoseaufnahme bzw. -freisetzung, Lipidstoffwechsel,

Harnstoffproduktion), die Herstellung und Abgabe von Gallenflüssigkeit, den Abbau und die Ausscheidung von Stoffwechselprodukten und Xenobiotika sowie die Produktion von Gerinnungsfaktoren und anderen Eiweißstoffen. Außerdem spielt sie eine Rolle bei der Regulation des Hormonsystems und zeichnet sich durch hohe Regenerationsfähigkeit aus (Jungermann, 1995).

Die Leber ist jedoch nicht nur wichtig für metabolische Funktionen, sondern ist auch ein lymphoides Organ mit immunologischen Eigenschaften. Sie ist an der angeborenen Immunantwort durch die Produktion von Akut-Phase-Proteinen (APP), unspezifische Phagozytose und unspezifisches Abtöten von Zellen beteiligt. Die Leber ist außerdem durch antigenabhängige und -unabhängige Deletion aktivierter T-Zellen, Induktion peripherer Toleranz, extrathymische Proliferation von T-Zellen und Deletion von immunologischen Signal- und Effektormolekülen an der adaptiven Immunantwort beteiligt (Parker and Picut, 2005).

Die humane Leber besteht aus zwei Leberlappen, während sich die der Maus in fünf große und zwei kleine Leberlappen unterteilt. Die Leberlappen setzen sich aus Leberläppchen (Lobuli) zusammen, welche wiederum aus Hepatozyten bestehen. Die Lobuli bilden ein Polygon aus Hepatozytenplatten, welche durch mikrovaskuläre Gefäße zwischen den Hepatozyten, die Sinusoide, getrennt sind. In den Ecken des Polygons bilden Portalvene, Leberarterie und Gallengang die sogenannte Glissonsche Trias. Die Leberarterie und die Portalvene versorgen die Leber mit Blut. Die Portalvene bringt nährstoffreiches venöses Blut aus dem Darm. Dabei gelangen kontinuierlich probiotische und potentiell pathogene bakterielle Produkte und Nahrungsantigene aus dem Darm in die Leber. Das sauerstoffreiche Blut der Leberarterie und das der Portalvene mischen sich in den Sinusoiden. Von dort wird es langsam ins Zentrum der Lobuli geleitet und fließt über die Zentralvene in die untere Hohlvene und somit zurück in die systemische Zirkulation (Ishibashi, et al., 2009).

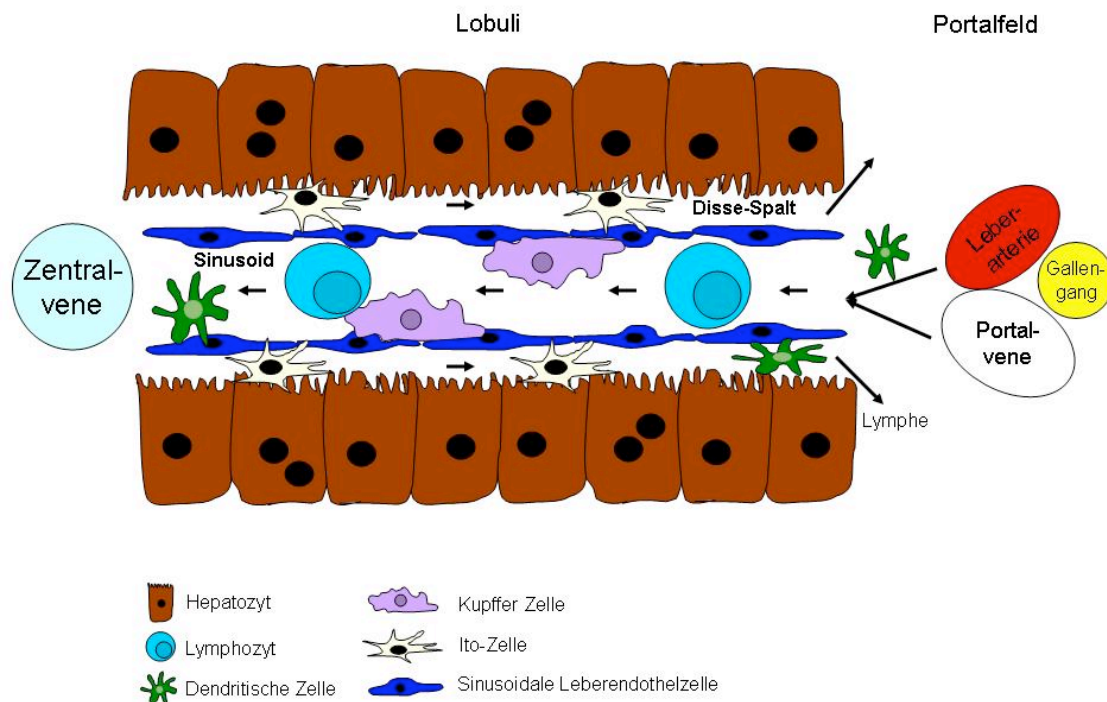
Die Sinusoide werden von sinusoidalen Leberendothelzellen ausgekleidet. Charakteristisch für das Leberendothel sind das Fehlen einer Basalmembran und die Perforation durch Fenestrae. Die parenchymalen Zellen sind durch einen schmalen Spalt, den Dissé-Spalt, von den Endothelzellen getrennt (Wisse 1970; Wisse, Dezanger et al. 1985). Im Dissé-Spalt sammelt sich die Lymphflüssigkeit, welche in die Lymphknoten geleitet wird. Das biliäre System wird ausschließlich mit Blut aus der Arterie versorgt.

### **1.2.2 Zellpopulationen in der Leber**

Die Hepatozyten stellen den Hauptteil der Zellen (70-80%) in der Leber und bilden das Parenchym (Racanelli and Rehermann, 2006). Alle anderen Zellen werden als nicht-parenchymale Zellen (NPC, nonparenchymal cells) bezeichnet. Den NPC werden die LSEC, Kupffer Zellen (KC, Kupffer cells), DC, Ito-Zellen, Cholangiozyten und intrahepatischen Lymphozyten (IHL) zugeordnet (Abb. 2).

Die intrahepatischen Lymphozyten (ca. 25% der NPC) (Racanelli and Rehermann, 2006) sind im Vergleich mit lymphatischen Geweben durch Unterschiede in der Zusammensetzung gekennzeichnet und befinden sich im Portaltrakt sowie im Parenchym (Norris, et al., 1998). In der Leber findet man

eine erhöhte Anzahl an NK-, und NKT-Zellen (jeweils ca. 30% der IHL), jedoch nur wenige B-Zellen (5%) (Eberl, et al., 1999). Etwa 20% der IHL sind  $\alpha\beta$  T-Zellen und 15% sind  $\gamma\delta$  T-Zellen. Des Weiteren sind die Anzahl von  $CD8^+$  T-Zellen im Verhältnis zu  $CD4^+$  T-Zellen und die Frequenz von Effektor/Gedächtnis T-Zellen im Vergleich zum Blut erhöht (Norris, et al., 1998 Klugewitz, et al., 2004; Klugewitz, et al., 2004).



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Zellpopulationen in der Leber.**

Das Blut aus der Leberarterie und der Portalvene mischt sich in den Sinusoiden und fließt in die Zentralvene, während die Fließgeschwindigkeit im Dissé-Spalt entgegengesetzt verläuft und in das Lymphsystem abgeleitet wird. Im Dissé-Spalt sind die Ito-Zellen lokalisiert. Die sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC, liver sinusoidal endothelial cells) trennen die Hepatozyten vom sinusoidalen Lumen, in dem sich die leberresidenten Makrophagen (Kupffer Zellen), intrahepatische Lymphozyten und Dendritische Zellen befinden. Abbildung nach (Racanelli and Rehermann, 2006).

### 1.2.3 Antigenpräsentation und Aktivierung von T-Zellen in der Leber

In der Leber wird kontinuierlich die Balance zwischen Regulation und Toleranz gegenüber Metaboliten, Nahrungsantigenen und bakteriellen Produkten und der Induktion einer effizienten Immunabwehr gegen hepatotrope Pathogene aufrechterhalten.

Mehrere der in Abschnitt 1.2.2 benannten Zellpopulationen können die Funktion von antigenpräsentierenden Zellen übernehmen. Als „klassische“ professionelle APZ sind in der Leber DC und KC vertreten. Doch auch die nicht-hämatopoetischen Zellpopulationen (LSEC, Hepatozyten, Cholangiozyten, Ito-Zellen) der Leber können im Gegensatz zu anderen soliden Organen aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften unter bestimmten Bedingungen den leberinfiltrierenden  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen und NKT-Zellen Antigen präsentieren.

Die Interaktion der verschiedenen Zellpopulationen wird durch eine weitere Besonderheit der Leber erleichtert. Aufgrund des geringen Durchmessers der Sinusoide (5-7µm) (Wisse, et al., 1985) und der Adhäsion von Kupffer Zellen an das Endothel ist die Fließgeschwindigkeit des Blutes in den Sinusoiden im Vergleich zu peripheren Blutgefäßen verringert (Komatsu, et al., 1990; Macphee, et al., 1995). Dies verlängert den Kontakt der zirkulierenden Lymphozyten mit LSEC, KC und Parenchymzellen und ermöglicht die selektinunabhängige Adhäsion an das Endothel (Wong, et al., 1997). Aktivierte und naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen akkumulieren hauptsächlich durch zwei Adhäsionsmoleküle in der murinen Leber: antigenabhängig mittels Intercellular-Adhesion-Molecule-1/Leukocyte-Function-Associated-Molecule-1 (ICAM-1/LFA-1) und antigenunabhängig durch Vascular-Adhesion-Molecule-1/Very-Late-Antigen-1 VCAM-1/VLA-4 (Bertolino, et al., 2005; John and Crispe, 2004).

### 1.2.3.1 Hepatozyten

Hepatozyten exprimieren MHC-I, ICAM-1 (Wahl, et al., 2008) sowie CD1d (Trobonjaca, et al., 2001), aber keine kostimulatorischen Moleküle. Allerdings kann Programmed-Death-Ligand-1 (PD-L1) auch als kostimulatorisches Signal agieren (Wahl, et al., 2008). Unter inflammatorischen Bedingungen können MHC-II, VCAM-1, ICAM-1, CD80, CD86 und CD40 hochreguliert werden (Sacher, et al., 2002). Dadurch können Hepatozyten mit CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie NKT-Zellen interagieren. In den Sinusoiden zirkulierende T-Zellen können trotz der Barriere aus LSEC und KC aufgrund der speziellen Architektur der Sinusoide direkt mit Hepatozyten interagieren. T-Zellen bilden zytoplasmatische Fortsätze (Mikrovilli), welche durch die Fenestrae der LSEC in den Dissé-Spalt reichen und mit der basolateralen Oberfläche der Hepatozyten Kontakt aufnehmen können. Hepatozyten bilden ebenfalls Mikrovilli, die in das sinusoidale Lumen ragen. Die Retention antigenspezifischer Zellen wird durch die Expression von LFA-1 in den Mikrovilli der T-Zellen und die polarisierte Expression von ICAM-1 und MHC-I/Peptidkomplex auf der basolateralen Seite der Hepatozyten vermittelt (Warren, et al., 2006).

#### 1.2.3.1.1 Antigenpräsentation und Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch Hepatozyten

*In vitro* konnte nachgewiesen werden, dass Hepatozyten APZ-Funktion aufweisen und eine effiziente Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen bewirken können. Durch Hepatozyten aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen entwickeln transient zytotoxische Aktivität, aber aufgrund der fehlenden Kostimulation durch CD28 erhalten sie von den Hepatozyten kein „Überlebenssignal“ und gehen in Apoptose („death by neglect“) (Bertolino, et al., 1998; Bertolino, et al., 1999).

Die intrahepatische Aktivierung naiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vivo* konnte in verschiedenen Modellen gezeigt werden. Dabei kam man in Abhängigkeit vom verwendeten Modell zu unterschiedlichen Ergebnissen, nämlich dass die Aktivierung in der Leber zu Toleranz und Apoptose/Deletion oder zur



Differenzierung von T-Zellen mit vollständiger Effektorfunktion führt (Bertolino, et al., 2002; Klein and Crispe, 2006; Wuensch, et al., 2006).

In den ersten transgenen Modellen zur Aktivierung von T-Zellen in der Leber wurden Mäuse verwendet, die unter der Kontrolle des Schaf-Metallothioneinpromotors ein allogenes MHC-I Molekül (H2-K<sup>b</sup>) exprimieren (Met-K<sup>b</sup>) (Morahan, et al., 1989). Der Transfer TZR-transgener antigenspezifischer naiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen (DES-TCR) in diese Tiere führte zur Infiltration der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in die Leber, Aktivierung durch die Hepatozyten, Induktion einer transienten Hepatitis und schließlich zur Deletion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Bertolino, et al., 2001). Aufgrund geringer ektoper Expression des Transgens durch knochenmarkabhängige Zellen in den Lymphknoten konnte eine gleichzeitige Aktivierung in Leber und Lymphknoten nicht ausgeschlossen werden. Die extrahepatische Aktivierung resultierte in voll aktivierten Effektor CD8<sup>+</sup> T-Zellen, welche in der Leber eine autoimmune Pathologie auslösten. War die Aktivierung auf die Leber beschränkt, wiesen die aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen defekte zytotoxische Funktion, geringere Lebensdauer und verstärkte Expression des proapoptischen Proteins Bim auf. Dies deutet darauf hin, dass Leberschädigung nur erfolgen kann, wenn die primäre Aktivierung im Lymphknoten erfolgt (Bowen, et al., 2004; Holz, et al., 2008). Im Vergleich der Met-K<sup>b</sup>-Maus mit der Alb-K<sup>b</sup>-Maus (Schonrich, et al., 1992), in der die Expression des allogenen MHC-I Moleküls unter Kontrolle des Albuminpromotors auf die Hepatozyten beschränkt ist, konnte dies bestätigt werden (Limmer, et al., 1998). In Alb-K<sup>b</sup>-Mäusen wurden transferierte Zellen nur in der Leber, aber nicht in den Lymphknoten aktiviert, proliferierten, waren aber weniger zytotoxisch, und konnten in Abwesenheit eines entzündlichen Kontexts keine Autoimmunreaktion in der Leber auslösen (Bowen, et al., 2004; Limmer, et al., 1998). Erfolgt also in diesen Modellen die Aktivierung in der Leber durch Hepatozyten, resultiert das in defekter Effektorfunktion und verringerter Lebensdauer der T-Zellen.

Andere Modelle zeigten jedoch, dass die Expression eines Antigens durch Hepatozyten zur vollständigen Aktivierung der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen führen kann (Klein and Crispe, 2006; Wuensch, et al., 2006). Wuensch *et al.* erzielten Transduktion und stabile Expression eines exogenen Antigens in Hepatozyten durch Injektion eines Adenovirus-assoziierten Vektors. Transferierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden in der Leber aktiviert, proliferierten und erlangten volle Effektorfunktion, wurden aber auch in Lymphknoten und Milz umverteilt. Klein *et al.* konnten in einem Lebertransplantationsmodell durch intrahepatische Präsentation eines Neoantigens nach dem Transfer antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen ebenfalls eine effiziente Aktivierung, Proliferation und Differenzierung zu zytotoxischen Effektorzellen nachweisen.

#### 1.2.3.1.2 Antigenpräsentation und Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch Hepatozyten

Die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist abhängig von der Antigenpräsentation über MHC-II und kostimulatorischen Signalen in den sekundären lymphoiden Organen. MHC-II Expression beschränkt sich weitestgehend auf professionelle APZ (Itano and Jenkins, 2003). Parenchymzellen in der

gesunden Leber sind MHC-II<sup>+</sup>, sie können jedoch im Rahmen einer Hepatitis oder viraler Infektionen in der Leber abberante Expression erlangen (Chu and Liaw, 1993; Franco, et al., 1988; Toyonaga, et al., 1994).

Wiegard *et al.* konnten *in vitro* eine Aktivierung naiver CD4<sup>+</sup> Zellen durch Hepatozyten nachweisen (Wiegard, et al., 2005). Ebenfalls *in vitro* konnte durch MHC-II<sup>+</sup> transgene Hepatozyten gezeigt werden, dass die Hepatozyten Antigenen prozessieren und CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentieren können (Herkel, et al., 2003). Dabei wurden naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Th2 polarisiert und konnten die IFN- $\gamma$ -Sekretion aktivierter Th1-Zellen supprimieren. *In vivo* führt die Expression von MHC-II auf Hepatozyten bei einer viralen Infektion zu einer Beeinträchtigung der IFN- $\gamma$  Produktion virusspezifischer CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen und zu einer längeren Persistenz des Virus. Demnach können MHC-II<sup>+</sup> Hepatozyten in einem inflammatorischen Milieu die Differenzierung von infiltrierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen in einen weniger inflammatorischen Phänotyp bewirken, was nicht zur Verstärkung der Entzündung beiträgt, sondern zur Unfähigkeit, die Viren zu beseitigen (Wiegard, et al., 2007).

### 1.2.3.2 Cholangiozyten

Biliäre Epithelzellen, die die intra- und extrahepatischen Gallengänge auskleidenden, machen etwa 5% der NPC aus (Racanelli and Rehermann, 2006). Dabei gibt es morphologische und funktionelle Unterschiede zwischen den Cholangiozyten, die die kleinen und die größeren Gallengänge auskleiden. Ihre Funktion besteht sowohl im Ableiten von Galle, den Abbauprodukten des Häm-Moleküls und entgifteter Metabolite aus den Hepatozyten in den Dünndarm als auch in der Interaktion mit dem angeborenen und adaptiven Immunsystem (Fava, et al., 2005). Cholangiozyten werden durch autokrine, endokrine und exokrine Zytokinsekretion beeinflusst. Diese wirken sich auf Proliferation, Apoptose, Choleastase, Fibrose und Karzinogenese aus (Fava, et al., 2005). Cholangiozyten bilden die erste Abwehr gegen Pathogene im biliären System. Sie exprimieren antimikrobielle Peptide (Defensine, Mx-Protein) und eine Reihe von PRR (Toll-like Rezeptoren, Nod-like Rezeptoren), die über die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden (NF- $\kappa$ B, MAPK) zur vermehrten Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine (MCP-1, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ ) führen. Dies und die Expression von Zytokin- und Chemokinrezeptoren für IL-4, -5, -6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  sowie Adhäsionsmolekülen (LFA-3, ICAM-1, CD40, CD95, MHC-I und MHC-II) ermöglicht die Rekrutierung und verstärkt die Interaktion mit T-Zellen, Kupffer Zellen und NK-Zellen (Chen, et al., 2008).

Aufgrund der Expression von MHC-II haben Cholangiozyten das Potential, als APZ zu agieren. Die Expression wird bei Verletzung des biliären Epithels und bei Stimulation mit IFN- $\gamma$  erhöht (Ayres, et al., 1993). Es konnte gezeigt werden, dass Cholangiozyten in der Lage sind, mitochondriale Antigene durch Phagozytose apoptotischer Cholangiozyten aufzunehmen und zu präsentieren (Allina, et al., 2006). Die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 werden jedoch nicht exprimiert (Leon, et

al., 1995). Ebenso deutet die Expression von PD-L1 und PD-L2 auf eine immunregulatorische Funktion der biliären Epithelzellen hin (Kamihira, et al., 2005).

### 1.2.3.3 Sinusoidale Leberendothelzellen

LSEC bilden eine Barriere für die Hepatozyten zum sinusoidalen Lumen hin und stellen den größten Anteil (50%) der NPC dar (Racanelli and Rehermann, 2006). Sie exprimieren konstitutiv MHC-I, MHC-II sowie die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 (Knolle, et al., 1999; Lohse, et al., 1996). Des Weiteren sind sie durch die Expression von Molekülen charakterisiert, die für die Aufnahme und Endozytose von Makromolekülen/Partikeln aus dem Blut verantwortlich sind (Mannose-, Scavenger-, Fc $\gamma$ -Rezeptor), sowie von Adhäsionsmolekülen, welche die Interaktion mit Lymphozyten ermöglichen (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1) (Knolle and Limmer, 2003; Schurich, et al., 2009). Dies verleiht LSEC die Fähigkeit zur Antigenaufnahme, -prozessierung und -präsentation. Nach Aktivierung von TLR-4 durch LPS exprimieren sie IL-10, was aufgrund verminderter Expression kostimulatorischer Moleküle zur Verminderung der APZ-Funktionen führt (Knolle, et al., 1999; Knolle, et al., 1998). Die Hauptfunktion der LSEC als APZ ist vermutlich Toleranzinduktion.

LSEC können lösliches Antigen mit ähnlicher Effizienz wie professionelle APZ aufnehmen und ohne vorherige Reifung für CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentieren. Die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch LSEC *in vitro* resultiert jedoch nicht in der Produktion der Th1-typischen Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$ . So aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind durch die Produktion von IL-4, IL-10 (Knolle, et al., 1999; Lohse, et al., 1996) sowie einen regulatorischen CD25<sup>low</sup>Foxp3<sup>-</sup> und *in vivo* antiinflammatorischen Phänotyp (Kruse, et al., 2009) charakterisiert.

Geringe Mengen löslichen Antigens, das entweder *i.v.* oder oral zugeführt wird, können durch LSEC prozessiert und über Kreuzpräsentation auf MHC-I Molekülen antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert werden. Kreuzpräsentation durch LSEC *in vitro* und *in vivo* führt jedoch zur Induktion funktionaler Toleranz der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Sie zeichnen sich durch fehlende Produktion von IL-2 und IFN- $\gamma$  sowie verringerte zytolytische Effektorfunktion aus (Berg, et al., 2006; Limmer, et al., 2000; Limmer, et al., 2005; von Oppen, et al., 2009).

Es existieren jedoch auch widersprüchliche Daten hinsichtlich der Aktivierung von T-Zellen durch LSEC. Katz *et al.* konnten nur eine sehr geringe Expression von MHC-II, CD80, CD86 und CD40 sowie geringe Aktivierung und Proliferation von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch Kokultur mit LSEC nachweisen (Katz, et al., 2004).

### 1.2.3.4 Kupffer Zellen

Als Kupffer Zellen werden die im Lumen der Sinusoide befindlichen leberresidenten Makrophagen bezeichnet. Ihr Anteil an den NPC beträgt ca. 20% (Racanelli and Rehermann, 2006). Die Hauptfunktion der KC ist die Phagozytose von apoptotischen Zellen und Mikroorganismen in den

Sinusoiden (Falasca, et al., 1996; Hirakata, et al., 1991). Sie können außerdem in das Parenchym einwandern, direkten Kontakt mit Hepatozyten aufnehmen und apoptotische Hepatozyten phagozytieren (Eipel, et al., 2007). Man kann KC in sessile (radioresistente) und knochenmarkabhängige (radiosensitive) Untergruppen einteilen. Beide Subpopulationen sind zwar phagozytisch aktiv, es wird aber angenommen, dass nur die radiosensitiven Kupffer Zellen an der Immunreaktion beteiligt sind (Klein, et al., 2007).

Kupffer Zellen werden mit immunogenen Reaktionen in Verbindung gebracht, ihnen werden aber auch immunsuppressive Funktionen zugeordnet. Unter physiologischen Bedingungen tragen Kupffer Zellen durch Synthese von IL-10 (Erhardt, et al., 2007; Knolle, et al., 1995) zur Toleranzinduktion in der Leber bei. Außerdem inhibieren sie die durch DC induzierte T-Zellproliferation über die von ihnen produzierten Prostaglandine (You, et al., 2008). Im Gegensatz dazu können sie nach Aktivierung durch LPS oder IFN- $\gamma$  inflammatorische Zytokine und Chemokine (TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1) sowie Stickstoffmonoxid sezernieren und tragen damit zur Leberschädigung bei (Giannandrea, et al., 2009; Kolios, et al., 2008; Nadler, et al., 2001).

KC können auch als APZ fungieren, da sie MHC-I sowie geringe Mengen MHC-II und die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 (Lohse, et al., 1996; You, et al., 2008) exprimieren. Sie besitzen die Fähigkeit, *in vitro* Antigen für CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu präsentieren und diese zu aktivieren. Allerdings sind sie, vermutlich aufgrund der geringen MHC-II Expression, weniger effizient als DC der Milz (You, et al., 2008).

### 1.2.3.5 Dendritische Zellen

Nur <1% der NPC der Leber sind Dendritische Zellen (Racanelli and Rehermann, 2006). Die konventionellen DC (myeloid und lymphoid) sind im Bereich der Portalfelder und der Zentralvene lokalisiert, während sich die plasmazytoiden DC im Leberparenchym befinden (Jomantaite, et al., 2004).

Dendritische Zellen sind die effizientesten APZ des Immunsystems. Vollständig aktivierte DC induzieren eine antigenspezifische Immunantwort, während unreife DC Toleranz induzieren (Hawiger, et al., 2001; Steinman and Nussenzweig, 2002). Die aus der Leber isolierte Gesamtpopulation Dendritischer Zellen ist weniger phagozytisch aktiv und weniger immunogen als DC aus der Milz. Die Mehrheit der CD11c<sup>+</sup> Zellen aus der Leber exprimiert nur geringe Mengen MHC-II und kostimulatorische Moleküle. Die verschiedenen Subtypen der hepatischen DC weisen aufgrund des heterogenen Reifungsphänotyps auch unterschiedliche Eigenschaften auf (Jomantaite, et al., 2004; Pillarisetty, et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass aus der Leber isolierte CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> und CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> DC *ex vivo* zu effektiven APZ differenzieren können (O'Connell, et al., 2000).

Der zur Charakterisierung von DC verwendete Oberflächenmarker CD11c stellt keinen exklusiven DC Marker dar, da er auch von NK-, B- und T-Zellen exprimiert wird (Jomantaite, et al., 2004). In der murinen Leber können vier DC-Subtypen unterschieden werden: lymphoide (CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>B220<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>),

myeloide ( $CD8\alpha^+B220^-CD11b^+$ ), plasmazytoide ( $CD8\alpha^+B220^+CD11b^-$ ) und NKDC (natural killer DC) ( $CD8\alpha^+B220^-NK1.1^+$ ) (Jomantaite, et al., 2004; Pillarisetty, et al., 2004). Es wurde nachgewiesen, dass DC aus dem Blut durch die Sinusoide und über den Dissé-Spalt in die drainierenden Lymphknoten migrieren (Kudo, et al., 1996).  $CD8\alpha^+$  DC sind verantwortlich für die Kreuzpräsentation und Induktion von Kreuztoleranz (Belz, et al., 2002). Durch *in vitro*- und *in vivo*-Versuche konnte nachgewiesen werden, dass  $CD11c^{high}MHC-II^{high}$  DC aus der Leber an der Kreuzpräsentation beteiligt sind (Plitas, et al., 2008).

### 1.2.3.6 Ito-Zellen

Die Ito-Zellen sind im Dissé-Spalt lokalisiert (Wisse, et al., 1985) und zu weniger als 1% in der Leber enthalten (Racanelli and Rehermann, 2006). Sie speichern 80% des Gesamtgehaltes des Körpers an Vitamin A in Form von Retinylpalmitat in zytoplasmatischen Lipidtropfen. Unter pathologischen Bedingungen (Leberfibrose) differenzieren sie zu Myofibroblasten und produzieren große Mengen extrazellulärer Matrixproteine (Kollagen, Laminin und Proteoglykane) (Sato, et al., 2003).

Ito-Zellen exprimieren MHC-I, MHC-II, CD1d und CD86 und können somit  $CD8^+$  und  $CD4^+$  T-Zellen sowie NKT-Zellen aktivieren (Winau, et al., 2007). Außerdem wurde *in vitro* eine endozytotische und phagozytotische Aktivität der Ito-Zellen nachgewiesen (Vinas, et al., 2003).

### 1.2.4 Periphere Toleranzinduktion in der Leber

Zur Induktion peripherer Toleranz durch die Leber werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Die Produktion von immunregulatorischen Zytokinen und inhibitorischen Liganden schafft ein tolerogenes Umfeld und begünstigt die Toleranzinduktion in der Leber. LSEC (Knolle, et al., 1999; Knolle, et al., 1998) und KC (Breous, et al., 2009; Erhardt, et al., 2007; Schlaak, et al., 1993) sezernieren z.B. IL-10. Hepatozyten (Wahl, et al., 2008), Cholangiozyten (Kamihira, et al., 2005), LSEC (Diehl, et al., 2008), KC, DC (You, et al., 2008) sowie Ito-Zellen (Bertolino, et al., 2001; Yu, et al., 2004) exprimieren PD-L1, das mit dem negativen Regulator der T-Zellaktivierung PD-1 auf aktivierten T-Zellen interagiert.

Des Weiteren trägt die Leber durch periphere Deletion aktivierter Zellen zur systemischen Toleranz bei. Dabei akkumulieren peripher oder in der Leber aktivierte  $CD8^+$  T-Zellen antigenabhängig und -unabhängig in der Leber und werden durch Apoptose deletiert (Bertolino, et al., 1995; Huang, et al., 1994; John and Crispe, 2004; Mehal, et al., 2001; Mehal, et al., 1999; Qian, et al., 1997).

Auch regulatorische T-Zellen haben einen Einfluss auf die Auslösung intrahepatischer Toleranz. *In vitro* wurde nachgewiesen, dass in Anwesenheit von  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen die Proliferation naiver  $CD4^+$  T-Zellen nach Stimulation durch KC und LSEC inhibiert wird. Zusätzlich stimuliert die Interaktion mit KC die Expansion von  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen (Wiegard, et al., 2005).

Die Induktion peripherer  $Foxp3^+$  Treg ist abhängig von Retinolsäure und TGF- $\beta$  (Coombes, et al., 2007; Sun, et al., 2007). Da Ito-Zellen beide Komponenten produzieren können, wird ihre Beteiligung

an der Induktion von Treg in der Leber vermutet (Winau, et al., 2008). Die periphere Induktion von Treg in der Leber wurde von Luth *et al.* demonstriert. In ihrem Modell bewirkte die ektopische Expression von MBP (myelin basic protein) in der Leber die Induktion MPB-spezifischer CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen. Diese konnten *in vitro* bereits in geringen Mengen die Proliferation konventioneller CD4<sup>+</sup> T-Zellen inhibieren und *in vivo* die Entstehung neuronaler Entzündung in einem Mausmodell der Multiplen Sklerose inhibieren (Luth, et al., 2008). Bochtler *et al.* zeigten, dass peripher oder in der Leber aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen einen Anstieg von CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg in der Leber zur Folge haben (Bochtler, et al., 2008). Es wird angenommen, dass diese Treg die Aktivität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen kontrollieren. Der Mechanismus ist aber noch ungeklärt. Des Weiteren können CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen zur Toleranz bei Lebertransplantation in der Maus beitragen (Li, et al., 2008).

### 1.3 Autoimmune Lebererkrankungen

#### 1.3.1 Überblick

Bei Autoimmunerkrankungen richtet sich das Immunsystem gegen körpereigene Antigene. Mögliche Ursachen dafür können sein: 1) eine unzureichende negative Selektion von T-Zellen im Thymus, 2) Störungen der peripheren Toleranzmechanismen, 3) eine irrtümliche Reaktion auf ein im inflammatorischen Kontext präsentiertes Autoantigen oder 4) eine Ähnlichkeit zwischen Fremd- und Selbstantigen („Molekulare Mimikry“) (Andre, et al., 1996; Goodnow, 1996; Rocken, et al., 1992; Wucherpfennig and Strominger, 1995).

Hepatozyten und Cholangiozyten sind die Zielzellen autoimmuner Reaktionen in der Leber. Autoimmune Lebererkrankungen können in drei Gruppen unterteilt werden: autoimmune Hepatitis (AIH), primär sklerosierende Cholangitis (PSC) und primäre biliäre Zirrhose (PBC) (Decock, et al., 2009). Die Ätiologie und Pathogenese dieser Erkrankungen sind nur unvollständig verstanden. Hepatozyten sind bei der AIH und Cholangiozyten der größeren Gallengänge bei PSC bzw. der kleinen Gallengänge bei PBC die Zielzellen der Autoimmunreaktion. Da klinische Symptome erst während fortgeschrittener Erkrankung auftreten, ist es schwierig, frühe Krankheitsstadien und erste Ereignisse bei der Entstehung zu analysieren. Die Definition des Autoantigens für PBC hat zum Verständnis der Pathogenese beigetragen. PBC ist charakterisiert durch die Anwesenheit antimitochondrialer Antikörper (AMA), die gegen die E2 Untereinheiten der 2-oxo-acid-Dehydrogenase Enzym-Komplexe (2-OACD) gerichtet sind (Yeaman, et al., 1988), sowie autoreaktive, für PDC-E2 (E2 Untereinheit des Pyruvat Dehydrogenase Komplexes) spezifische, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Kita, et al., 2002; Shimoda, et al., 1998). Die immunologischen Vorgänge, die zur Entstehung von AIH und PSC führen, sind noch wenig verstanden.

### 1.3.2 Autoimmune Hepatitis

Die AIH ist eine chronische Hepatitis, bei der es zu einer Zerstörung des Leberparenchyms kommt. Die Ursache ist ungeklärt, aber es besteht eine Assoziation mit bestimmten HLA-Allelen (B8, DR3, DR4) und anderen genetischen Polymorphismen (Longhi, et al., 2009; Vergani, et al., 2009). Wie bei den meisten Autoimmunerkrankungen sind auch bei der AIH mehr Frauen als Männer betroffen (Verhältnis 3,5:1) (Czaja and Donaldson, 2002). Aufgrund der Spezifität der vorhandenen Autoantikörper wird weiter in AIH Typ 1 und 2 differenziert. Die AIH wird außerdem durch erhöhte Serumtransaminasen und einen übermäßigen Gehalt an  $\gamma$ -Globulinen im Blut (Hypergammaglobulinämie) diagnostiziert (Longhi, et al., 2009; Vergani, et al., 2009).

Histologisch ist die AIH durch ein portales und periportales, in das Parenchym eindringendes und im akuten Stadium auch lobuläres mononukleäres Infiltrat charakterisiert. Dieses setzt sich überwiegend aus T- und B-Lymphozyten und Makrophagen zusammen, aber auch Plasma-Zellen sammeln sich zwischen den inflammatorischen Zellen.  $CD4^+$  T-Zellen überwiegen im portalen Infiltrat und  $CD8^+$  T-Zellen im Bereich der Grenzzonenhepatitis (Eggink, et al., 1982; Hashimoto, et al., 1993; Longhi, et al., 2009; Vergani, et al., 2009). Die die Leber infiltrierenden T-Zellen weisen eine Verschiebung des T-Zellrezeptorrepertoires auf, was auf eine oligoklonale Expansion der T-Zellen schließen lässt (Hoshino, et al., 1995). Bei Patienten mit AIH wurde im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine verringerte Anzahl regulatorischer T-Zellen und Defekte in deren Funktion sowie eine verringerte Expression von Foxp3 im peripheren Blut beschrieben (Longhi, et al., 2006; Longhi, et al., 2004; Longhi, et al., 2005). In der Leber sind die Foxp3<sup>+</sup> Zellen im Bereich des Infiltrates im Portaltrakt vermehrt (Lan, et al., 2006).

Zur Entstehung einer immunologischen Aktivität gegen das Leberparenchym müssen neben der genetischen Prädisposition sowohl autoreaktive B- und T-Zellen vorhanden sein als auch die Präsentation von Autoantigen im Kontext von MHC-I und MHC-II erfolgen. Die initiale Durchbrechung der Toleranz könnte durch Toxine, virale Infektion, Aktivierung von T-Zellen durch freigesetzte Zytokine („Bystander-Effekt“), polyklonale Aktivierung von Lymphozyten oder durch Kreuzreaktivität („Molekulare Mimikry“) erfolgen (Christen, et al., 2009; Longhi, et al., 2009).

### 1.3.3 Primär sklerosierende Cholangitis

Bei der PSC werden die mittelgroßen und großen intra- und extrahepatischen Gallengänge zerstört. Es kommt zu einer Einschränkung der Leberfunktion und zur Fibrosierung des Lebergewebes, und es erhöht sich das Risiko der Entstehung eines cholangiozellulären Karzinoms. Da hauptsächlich Männer betroffen sind, kein definiertes Autoantigen bekannt ist und immunsuppressive Therapien ineffektiv sind, wird die autoimmune Genese angezweifelt und eher eine Fehlregulation des angeborenen Immunsystems diskutiert. Die PSC tritt jedoch häufig kombiniert mit anderen autoimmunen Erkrankungen (chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Diabetes mellitus Typ 1, Morbus Basedow) auf, ist mit bestimmten HLA-Allelen assoziiert und es sind Autoantikörper nachweisbar

(Aron and Bowlus, 2009). Auch bei der PSC findet man eine Einengung des T-Zellrezeptorrepertoires der infiltrierenden T-Zellen (Broome, et al., 1997). Das portale mononukleäre Infiltrat besteht hauptsächlich aus CD3<sup>+</sup> T-Zellen (Ponsioen, et al., 1999). Im Vergleich zur gesunden Leber sind in der chronisch entzündeten Leber bei der PSC Foxp3<sup>+</sup> Treg im Bereich des Portaltraktes vermehrt. Diese sind *in vitro* funktionelle Suppressorzellen und sezernieren IL-10 (Eksteen, et al., 2006). Es ist unklar, ob die biliären Epithelzellen das primäre Ziel der Immunreaktion darstellen oder sekundär zerstört werden.

Aufgrund der Assoziation mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen basiert eine der Hypothesen zur Ätiologie der PSC auf der Migration intestinaler Lymphozyten in die Leber (enterohepatischer Kreislauf) (Grant, et al., 2002). Die aberrante Expression von MAdCAM-1 bei PSC und AIH in den Ästen der Portalvene und im sinusoidalen Endothel (Grant, et al., 2001) sowie von CCL25 im periportalen sinusoidalen Endothel bei der PSC (Eksteen, et al., 2004) könnte zur Infiltration und Adhäsion von im mesenterialen Lymphknoten oder Peyer'schen Plaques aktivierten CCR9<sup>+</sup>α4β7<sup>+</sup> Lymphozyten an das hepatische Endothel (Aron and Bowlus, 2009; Eksteen, et al., 2004) führen.

#### **1.4 Tiermodelle für autoimmune Lebererkrankungen**

Bei autoimmunen Lebererkrankungen ist es aufgrund der späten Diagnose und des heterogenen genetischen Hintergrundes schwierig, initiale immunologische Vorgänge am Menschen zu untersuchen. Mausmodelle sind notwendig, um die Entstehung zu erforschen, pathophysiologische Prozesse zu verstehen und neue Therapien und Präventionsmöglichkeiten zu entwickeln. Auch sind die Modelle zum besseren Verständnis der immunologischen Prozesse, wie z.B. der Antigenpräsentation und Toleranzinduktion in der Leber, sowie der Interaktionsmöglichkeiten zwischen angeborener und adaptiver Immunabwehr von Vorteil (Christen, et al., 2009).

##### **1.4.1 Tiermodelle der AIH**

Das ideale Tiermodell der AIH sollte ein definiertes auslösendes Ereignis haben, das in einer chronischen Leberentzündung mit Beteiligung von B-Zellen und Autoantikörpern resultiert und anschließend zu Fibrose führt (Longhi, et al., 2009). Da die AIH eine sehr heterogene Erkrankung ist, konnte bisher kein Tiermodell entwickelt werden, das alle Eigenschaften und Merkmale des humanen Krankheitsbildes aufweist. Aufgrund der tolerogenen Umgebung in der Leber ist es schwierig, organspezifische Autoimmunität auszulösen. Es existiert eine Reihe von Tiermodellen, bei denen Fremdartigene ein Hepatitis-ähnliches Krankheitsbild auslösen. Keines bietet eine Möglichkeit, die komplexen Vorgänge bei der Entstehung der AIH zu simulieren. Die meisten Modelle erzielen nur eine transiente Leberschädigung (Christen, et al., 2009). Im folgenden Abschnitt wird eine Auswahl der bekannten Modelle näher beschrieben.



Bei den ersten murinen Tiermodellen wurde die Hepatitis durch wiederholte Injektion von allogenem Leberhomogenisat zusammen mit Freund's Adjuvans ausgelöst (Scheiffarth, et al., 1965). Durch den Transfer von Lymphozytensuspension aus sensibilisierten Tieren konnte die Leberentzündung in gesunden Empfängern induziert und eine autoimmune Genese nachgewiesen werden (Scheiffarth, et al., 1967).

Concanavalin A (ConA) induzierte Hepatitis wird als ein zytokininduziertes experimentelles Modell für die humane AIH angesehen (Tiegs, et al., 1992). Eine einzige Injektion von ConA führt zu unspezifischer T-Zellstimulation, akuter Hepatitis mit gemischtem Zellinfiltrat (Lymphozyten, Neutrophilen, Makrophagen) und zur Nekrose und Apoptose der Hepatozyten. NKT-Zellen sind essentiell für die Entstehung der ConA-induzierten Hepatitis (Bertolino, et al., 1995; Takeda, et al., 2000). Im ConA-Modell können jedoch keine Autoantikörper generiert werden und es wird eine letale fulminante Hepatitis statt einer chronischen Hepatitis induziert.

Seitdem transgene Techniken zur Entwicklung von Tiermodellen der AIH genutzt werden, haben sich die Tiermodelle zur Antigenpräsentation in der Leber anfangs auf eine Alloreaktion und Expression eines fremden MHC-I Moleküls auf Hepatozyten beschränkt (Met-K<sup>b</sup>, Alb-K<sup>b</sup>) (Bertolino, et al., 1995; Morahan, et al., 1989; Schonrich, et al., 1992). Dabei wird der MHC-I Allel/Peptid-Komplex jedoch nur direkt auf den Hepatozyten erkannt. Diese Modelle repräsentieren somit keine physiologischen Bedingungen und ermöglichen nicht die Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen durch professionelle APZ, da das allogene MHC-I Molekül nicht auf APZ präsentiert wird. Diese Bedingung wird jedoch in dem in dieser Arbeit verwendeten TF-OVA Modell sowie im OVA-HEP Modell, in dem membrangebundenes Ovalbumin unter der Kontrolle des Albumin-Promotors in den Hepatozyten exprimiert wird, erfüllt (Buxbaum, et al., 2008).

Einige Modelle wählen den Ansatz der Präsentation von Antigen in einem proinflammatorischen Kontext in der Leber. Im Modell von Voehringer *et al.* wird die leberspezifische Expression eines Fremdanagens (LCMV gp33) erzielt (Voehringer, et al., 2000). Das CD8 T-Zell Epitop von LCMV gp33 wird unter der Kontrolle des Albuminpromotors in der Leber exprimiert und vom MHC-I Molekül H-2D<sup>b</sup> präsentiert, jedoch von antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen ignoriert. Die Toleranz wird erst durch eine Infektion mit lymphozytärem Choriomeningitis-Virus (LCMV) vor dem Zelltransfer gebrochen. Wird Nukleoprotein (NP) leberspezifisch exprimiert, entwickeln die Mäuse fünf Monate nach der Immunisierung mit einem LCMV-NP und IL-12 exprimierenden Plasmid eine autoimmune Hepatitis (Djilali-Saiah, et al., 2002). DNA-Immunisierung von Wildtyp C57Bl/6 Mäusen gegen humane Autoantigene für Typ 2 AIH und mit einem IL-12 exprimierenden Plasmid durchbricht die Toleranz in der Leber und induziert eine Leberentzündung. Diese wurde durch erhöhte ALT-Werte, leberinfiltrierende Lymphozyten und Antikörper gegen die murinen homologen Proteine charakterisiert (Lapierre, et al., 2004).

Weitere neuere Modelle basieren auf der Hypothese, dass molekulare Mimikry genutzt werden kann, um Toleranz gegen ein Leberantigen zu durchbrechen und eine chronische Autoimmunreaktion gegen

die Leber hervorzurufen. Beispielsweise werden in einem Modell für AIH Typ 2 Wildtyp und Cytochrom P450 2D6 (CYP2D6) transgene Mäuse mit Adenovirus-CYP2D6 Vektor infiziert. Die Infektion mit dem das humane Autoantigen exprimierenden Virus führt zur Durchbrechung der Toleranz, was in chronischer autoimmuner Leberschädigung (leberinfiltrierende Lymphozyten, Fibrose, Generierung CYP2D6 spezifischer Antikörper) resultiert (Holdener, et al., 2008).

#### 1.4.2 Tiermodelle der PSC

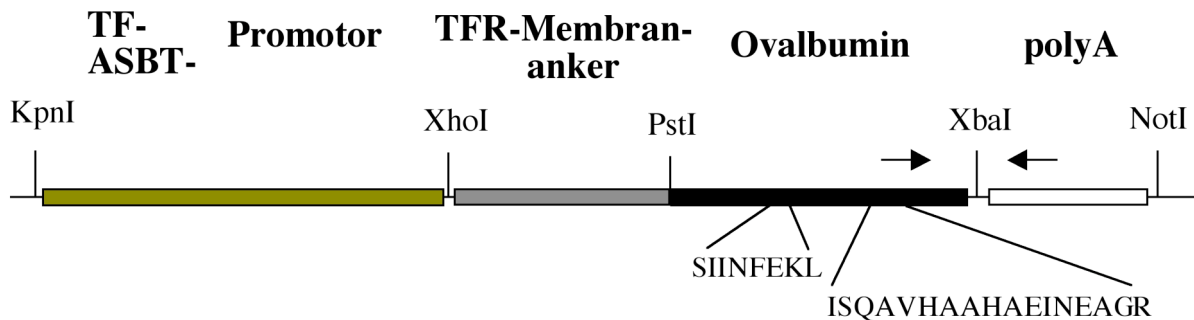
Bislang gibt es kein Tiermodell, das den immunologischen Grundlagen der PSC gerecht wird. Diverse Tiermodelle stützen sich auf infektiöse Auslöser (*Helicobacter spec.*, *Bacteroides spec.*), bakterielle Proteine (z.B. fMLT: N-Formyl L-Methionin L-Leucin, L-Tyrosin, proinflammatorisches Peptid sezerniert von *E.coli*), Toxine (TNBS: 2,4,6-Trinitrobenzen Sulfonsäure) oder primäre Schädigung von Epithel- oder Endothelzellen (Vierling, 2001). Ein neueres Modell beruht auf der genetischen Deletion des Multi-Drug-Resistance-Gens (*Mdr2*<sup>-/-</sup>), die durch Fehlen biliärer Phospholipide zur Zerstörung der Cholangiozyten durch Galle und zur Sklerose der Gallenwege führt (Fickert, et al., 2004). Die bisher entwickelten Modelle geben Einblick in die Bedeutung bakterieller Komponenten bei der Entstehung von Gallengangsläsionen, tragen jedoch wenig zum Verständnis der Immunopathogenese der PSC bei.

Buxbaum *et al.* haben unabhängig von dem in dieser Arbeit verwendeten Mausstamm ASBT-OVA ein transgenes Mausmodell mit immunbedingter hepatobiliärer Schädigung entwickelt (OVA-BIL) (Buxbaum, et al., 2006). Membrangebundenes Ovalbumin wird unter der Kontrolle des ASBT-Promotors in den Gallengangsepithelzellen exprimiert, und antigenspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen werden nach adoptivem Transfer aktiviert und induzieren eine Entzündung in der Leber.

#### 1.5 Generierung von ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der Antigenpräsentation in der Leber wurden zwei transgene Mausstämme, TF-OVA und ASBT-OVA, generiert. Die Plasmidkonstrukte für beide Mauslinien enthalten die Sequenz für einen Teil des Ovalbuminproteins (Aminosäuren 139-385) mit den Epitopen für MHC-I (OVA<sub>257-264</sub>: SIINFEKL) und MHC-II (OVA<sub>323-339</sub>: ISQAVHAAHAEINEAGR) (Abb. 3). Um die Insertion in die Membran zu erzielen sowie die Sekretion und Verteilung des Proteins im gesamten Organismus zu verhindern, wurde OVA<sub>139-385</sub> mit einem Teil des humanen Transferrinrezeptors (Aminosäuren 1-118, die den zytoplasmatischen Anteil sowie Signal- und Transmembrandomäne enthalten) fusioniert (Kurts, et al., 1996). Die gewebespezifische Expression des Fusionsproteins wird durch den Transferrin-Promotor in den Hepatozyten (TF-OVA) bzw. den apikalen Natrium-abhängigen Gallensalztransporter (apical sodium bile dependent transporter) in den Cholangiozyten der mittelgroßen und großen Gallengänge (ASBT-

OVA) erzielt. Dazu wurden 2900 bp 5' des jeweiligen Transkriptionsstarts aus der genomischen DNA von C57Bl/6 Mäusen amplifiziert und vor das Fusionsprotein kloniert. Die transgenen Mauslinien ASBT-OVA und TF-OVA wurden in Boston (Harvard Medical School) durch Dr. E. Schott hergestellt.



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der DNA-Konstrukte, die zur Generierung der Stämme ASBT-OVA und TF-OVA verwendet wurden.

Sie kodieren für das Fusionsprotein bestehend aus der Transmembrandomäne des Transferrinrezeptors (TFR) und OVA<sub>139-385</sub> unter der Kontrolle des Transferrin (TF)- oder Apical Sodium Bile dependent (ASBT)-Promotors.

TF-OVA repräsentiert das Modell für autoimmune Hepatitis, während ASBT-OVA als Mausmodell für autoimmune Cholangitis dient. Ovalbumin wurde aufgrund folgender Vorteile als Modellantigen gewählt: 1) die Epitope für CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind charakterisiert, 2) es existieren TZR transgene Mäuse, die antigenspezifische CD8<sup>+</sup> oder CD4<sup>+</sup> T-Zellen produzieren (Barnden, et al., 1998; Hogquist, et al., 1994), 3) es gibt bereits beschriebene Tiermodelle, in denen gewebespezifische Expression von Ovalbumin Autoimmunität auslöst (Kurts, et al., 1996; Vezys, et al., 2000).

Der Promotor für Transferrin hat eine weitgehend auf die Leber beschränkte Expression (Idzerda, et al., 1986). Des Weiteren wurde dieser Promotor bereits hinsichtlich der für die gewebespezifische Expression verantwortlichen Promotorsequenzen charakterisiert (Idzerda, et al., 1989). ASBT wird spezifisch in den Cholangiozyten der großen und mittelgroßen Gallengänge (Alpini, et al., 1997) sowie den Enterozyten des terminalen Ileums exprimiert, wo der Transporter die Rückresorption der Galle aus dem Darm ermöglicht (Dawson, et al., 2009). Der ASBT-Promotor wurde gewählt, weil eine *in vitro*-Charakterisierung der aktiven Sequenz vorhanden ist (Chen, et al., 2001; Chen, et al., 2003) und das Expressionsmuster mit dem Befallsmuster bei PSC übereinstimmt.

Basierend auf der transgenen Expression des Modellantigens Ovalbumin in der Leber wird die Präsentation durch die Zielzellen (Hepatozyten bzw. Cholangiozyten) und durch professionelle APZ (sowohl über MHC-I, MHC-II und Kreuzpräsentation) ermöglicht. Dies gestattet die differenzierte Analyse des Beitrages der verschiedenen Populationen von APZ bei der Antigenpräsentation sowie bei der Entstehung von Autoimmunität und Toleranz. Dadurch wird es möglich, die initialen pathogenetischen Mechanismen bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen der Leber nach der Antigenerkennung durch adoptiv transferierte autoreaktive CD8<sup>+</sup> und/oder CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu untersuchen.

## 2 Zielsetzung

Die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen der Leber, bei denen Hepatozyten und Cholangiozyten die Zielzellen autoimmuner Reaktionen sind, ist unzureichend verstanden. Aufgrund der späten Diagnose ist es schwierig, initiale immunologische Vorgänge am Menschen zu untersuchen. Die Entwicklung und Anwendung von Tiermodellen in diesem Bereich ist von essentieller Bedeutung, um Mechanismen der Antigenpräsentation sowie Toleranzinduktion in der Leber zu verstehen und neue Therapien und Präventionsmöglichkeiten zu erforschen. Bei Beginn der Arbeit standen nur unzureichende Modelle zur Untersuchung der gleichzeitigen Aktivierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch ein endogenes hepatisches Antigen *in vivo* in der Leber zur Verfügung, und der Mechanismus der Kreuzpräsentation wurde nicht ausreichend berücksichtigt. Des Weiteren war noch unklar, ob die Präsentation von Antigen für CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber zur Aktivierung und Differenzierung in Effektorzellen führt. Über die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber war wenig bekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Antigenpräsentation und Aktivierung von T-Zellen durch ein von Hepatozyten bzw. Cholangiozyten exprimiertes Antigen zu untersuchen. Im Detail ergaben sich folgende Fragestellungen:

- 1) Können CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vivo* durch hepatisch exprimiertes Antigen aktiviert werden und erfolgt die Aktivierung in der Leber selbst oder in den lymphatischen Organen?
- 2) Werden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach der Aktivierung tolerant oder erlangen sie die Fähigkeit, zu Effektorzellen zu differenzieren?
- 3) Welche Zellen präsentieren bzw. kreuzpräsentieren das hepatische Antigen den CD8<sup>+</sup> T-Zellen?
- 4) Welche Bedeutung haben CD4 Subpopulationen bei der durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen bedingten Hepatitis?

Zur Untersuchung dieser Fragestellungen *in vivo* wurden transgene Mausmodelle verwendet. Diese exprimieren ein definiertes Modellantigen (Ovalbumin) in der Leber, spezifisch in den Cholangiozyten der größeren Gallengänge (ASBT-OVA) bzw. in Hepatozyten (TF-OVA). Nach dem adoptiven Transfer T-Zellrezeptor-transgener CD8<sup>+</sup> und/oder CD4<sup>+</sup> T-Zellen in diese Mauslinien sollten das Migrations- und Proliferationsverhalten und der Phänotyp der T-Zellen sowie die Entstehung von Autoimmunität in den Empfängermäusen unter unterschiedlichen Bedingungen betrachtet werden. Die Bedeutung von CD4 Subpopulationen sollte durch Transfer von *in vitro* polarisierten Effektor CD4<sup>+</sup> T-Zellen in TF-OVA Mäuse sowie durch Depletion regulatorischer T-Zellen in TF-OVAxDEREG Mäusen charakterisiert werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

Bestrahlungsanlage für Mäuse ( $\gamma$ -Irradiator), Biobeam 2000	STS Steuerungstechnik und Strahlenschutz GmbH, Braunschweig
Bestrahlungsgerät für Zellen (Cäsiumquelle), Typ OB 29/4/9503-11	Institut für Transfusionsmedizin, Charité Berlin, Campus Virchow Klinikum
Brutschrank Labotect Inkubator C2000	Labotect, Göttingen
Durchflusszytometer FACSCalibur™	Becton Dickinson, Heidelberg
Elektrophorese- und Blotapparaturen für Minigele	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Elektrophoresekammern für Agarosegele	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Kryostat, 2800 Frigocut E	Reichert-Jung, Nussloch
Mikrotom, Microm Coolcut HM355S	Microm, Walldorf
MidiMACS- und MiniMACS-Magneten und MACS- Ständer	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach
Mikroskope: Axiovert 25 und Axiophot	Carl Zeiss, Jena
Spektrophotometer DU® 640	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Sterilwerkbank LaminAir® HBB 2448	Heraeus Instruments, Hanau
„Sonifikator“ Sonoplus	Bandelin electronic, Berlin
Thermocycler GeneAmp PCR System 96000	PerkinElmer, Waltham, USA
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Vortexer	VWR International, Darmstadt
Wasserbad Julabo U3	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Zentrifugen:	
Tischzentrifuge 5415R,	Eppendorf, Hamburg
Megafuge 1.0,	Heraeus Instruments, Hanau
Rotina 420R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

##### 3.1.2 Sonstige Materialien und Verbrauchsmaterialien

Dako REAL™ Capillary Gap Objektträger	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Deckgläser (24x32mm)	Menzel-Gläser, Braunschweig
Einmal-Spritzen und -Kanülen	BD Discardit™, Microlance™, Becton Dickinson, Heidelberg
Farbnegativfilm AGFA/ Cronex 5	Agfa, Mortsel, Belgien

FACS-Röhrchen	BD Falcon <sup>®</sup> , Becton Dickinson, Heidelberg
Gefäß zur Plasmagewinnung mit Trenngel (Lithium-Heparin)	Kabe Labortechnik GmbH, Nümbrecht- Elsenroth
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schüll, Dassel
Hämatokrit-Kapillaren, heparinisiert	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
MACS <sup>®</sup> Pre-Separation Filters	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch-Gladbach
MACS <sup>®</sup> Separationcolumns LS und MS	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch-Gladbach
Mikrotom Einmalklingen Typ A 35	Feather Safety Razor Co., Ltd., Japan
Nahtmaterial 5-0 (70cm)	Ethicon, Johnson&Johnson Medical GmbH
Neubauer Zählkammer	LO-Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf
Nylonmembran (PVDF)	Millipore, Schwalbach ITS
OP-Besteck	Aesculab AG, Tuttlingen
OP-Abdecktuch	Lohmann&Rauscher GmbH&Co. KG, Neuwied
PCR-Softtubes	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Reaktionsgefäße 1,5ml und 2ml	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen 15ml, 50ml	BD Falcon <sup>®</sup> , Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilfilter Nalgene	Nalge Nunc Int. Corp., Rochester, USA
SuperFrost <sup>®</sup> Plus Objektträger	R. Langenbrinck, Teningen
Tissue-Tek <sup>®</sup> Kassetten	Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL
Zellsieb (70 µm)	BD Falcon <sup>®</sup> , Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturgefäße, -platten	BD Falcon <sup>®</sup> , Becton Dickinson, Heidelberg

Weitere hier nicht aufgeführt verwendete Plastik- und Verbrauchsmaterialien stammten von den Firmen Corning Inc. oder Becton Dickinson.

### 3.1.3 Chemikalien/Reagenzien

Agarose	Serva, Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Antiinfektivum Baytril <sup>®</sup> , 2,5%	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bovines Serumalbumin, Fraktion V	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Carboxyfluorescein-succinimidyl-ester (CFSE)	Invitrogen GmbH (Molecular Probes), Karlsruhe
Diamidinophenylindol (DAPI)	Roche, Mannheim
Diphtherie Toxin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Eosin	Merck KGaA, Darmstadt
FTY720 (2-Amino-2-[2-(4-Octylphenyl) Ethyl]-1,3-Propandiol Hydrochlorid)	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Fötales Kälberserum (FCS), hitze-inaktiviert für 30min bei 56°C	Biochrom AG, Berlin
L-Glutamin (200mM)	Invitrogen GmbH (Gibco), Karlsruhe
Hämatoxylin	Merck KGaA, Darmstadt
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaisers Glyceringelatine f. d. Mikroskopie	Merck KGaA, Darmstadt
Ketaminhydrochlorid	Actavis GmbH & Co. KG, Langenfeld
Magermilchpulver	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
NycoPrep™ Universal	Axis-Shield PoC AS, Oslo
Ovalbuminprotein (OVA), Grad V	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ovalbuminpeptid (OVA <sub>323-339</sub> ) Sequenz: ISQAVHAAHAEINEAGR	Institut für Biochemie, Humboldt Universität Berlin
Ovalbuminpeptid (OVA <sub>257-264</sub> ) Sequenz: SIINFEKL	Institut für Biochemie, Humboldt Universität Berlin
Paracetamolösung	Ratiopharm, Ulm
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ParaplastPlus, Tissue Embedding Medium	McCormick Scientific, St. Louis, USA
PBS ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Invitrogen GmbH (Gibco), Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ 10 mg/ml)	Biochrom AG, Berlin
Percoll (1,124g/ml)	Biochrom AG, Berlin
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Propidiumiodid (1mg/ml)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rosewell Park Memorial Institute Medium (RPMI 1640)	Invitrogen GmbH (Gibco), Karlsruhe
Roti® - Histol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Saponin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL
Trypan-Blau Lösung (0,4%)	Biochrom AG, Berlin
Xylazinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Sämtliche Chemikalien, welche hier nicht aufgeführt sind, wurden von Sigma-Aldrich, Carl Roth GmbH & Co.KG oder Merck KGaA bezogen.

### 3.1.4 Enzyme und rekombinante Proteine

Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablette	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNase I	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
rekombinantes murines IFN- $\gamma$	Invitrogen GmbH (Bioscience), Karlsruhe
rekombinantes murines IL-12	Invitrogen GmbH (Bioscience), Karlsruhe
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

### 3.1.5 Größenstandards

DNA-Marker (Ready-Load 1Kb DNA Ladder)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Protein-Marker (SeeBlue <sup>®</sup> Plus2 Pre-Stained)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

### 3.1.6 Vorgefertigte Systeme (Kits)

Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Cytofix/Cytoperm <sup>™</sup> Solution	BD Biosciences, Heidelberg
D <sub>C</sub> Protein Assay (nach Lowry)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Enhanced Chemiluminescence Detection Kit	PerkinElmer, Waltham, USA
Foxp3-APC Staining Kit	eBioscience, San Diego, USA
In situ Cell Death Detection Kit, TMR red	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MACS Microbeads und Zellisolationskits	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch-Gladbach
Platinum <sup>®</sup> PCR SuperMix	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RNeasy Mini Kit	Qiagen , Hilden

### 3.1.7 Medien

Komplett-RPMI	RPMI 1640, 10% FCS (v/v), 100U/ml Penicillin/Streptomycin, 2mM L-Glutamin, 50 $\mu$ M $\beta$ -Mercaptoethanol
Th1-Medium	Komplett-RMPI, 5ng/ml IL-12, 5 $\mu$ g/ml $\alpha$ IL-4, 20ng/ml IFN- $\gamma$ , 5 $\mu$ g/ml OVA <sub>323-339</sub>

### 3.1.8 Puffer und Lösungen

Citrat-Puffer (pH 6,0)	21g Citronensäure auf 1L ddH <sub>2</sub> O
DAPI-Lösung	0,2mg/L in ddH <sub>2</sub> O
DNA-Agarosegelelektrophorese-Ladepuffer (5x)	20mM Tris (pH 7,6), 50mM EDTA, 45% Saccharose, 0,25% Bromphenol, 0,25% Xylencyanol
Erythrozyten-Lyse-Puffer (pH 7,4)	150mM NH <sub>4</sub> Cl, 1mM KHCO <sub>3</sub> , 0,1mM EDTA



Ethidiumbromidstammlösung	10mg/ml
Fixierungslösung	1x PBS, 2% PFA
MACS-Puffer	1x PBS, 0,5% BSA, 2mM EDTA
PBS/BSA	1x PBS, 0,5% BSA
PBS/Tween-Puffer	1x PBS, 0,1% Tween 20 (v/v)
PFA-Lösung (pH 7,0)	4% PFA in 1x PBS
Sammelgel (5,6%)	937µl Acrylamid/Bisacrylamid (30%), 315µl 2M Tris (pH 6,8), 50µl SDS, 3,75µl ddH <sub>2</sub> O, 50µl 10% Ammoniumpersulfat, 5µl TEMED
Schwanzlyse-Puffer (pH 8,5)	100mM Tris, 10mM EDTA, 200mM NaCl, 0,2% SDS
SDS-PAGE Probenpuffer (5x)	250mM Tris (pH 6,8), 500mM DTT, 10% SDS, 50% Glycerin, 0,5% Bromphenolblau
SDS-PAGE Laufpuffer (10x)	25mM Tris, 192mM Glycin, 0,1% SDS
Trenngel (12,5%)	4,17ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%), 1,875ml 2M Tris (pH 8,8), 100µl 10% SDS, 3,76ml ddH <sub>2</sub> O, 100µl 10% Ammoniumpersulfat, 5µl TEMED
TAE - Puffer (pH 8)	40mM Tris, 1mM EDTA-Lösung, 20mM Eisessig
Western Blot Blotpuffer (10x)	250mM Tris, 192mM Glycin
Western Blot Blockpuffer	1x PBS, 0,1% (v/v) Tween 20, 5% (w/v) Magermilchpulver
Western Blot Transferpuffer	1x Blotpuffer, 10% Ethanol
Zelllyse-Puffer	20mM Tris (pH 7,8), 150mM NaCl, 2mM EDTA, 50mM β-Glycerolphosphat, 0,5% NP-40, 1% Glycerin

Wässrige Lösungen wurden mit ddH<sub>2</sub>O angesetzt und wenn notwendig autoklaviert oder steril filtriert.

### 3.1.9 Synthetische Oligonukleotide

Tab. 1: Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' → 3')	Spezifität
OVA up	CAAGCACATCGCAACCA	Ovalbumin <i>Gallus gallus</i>
OVA down	GCAATTGCCTTGTCAGCAT	
Aktin up	CATGTGCAAAGCCGGCTTC	β-Aktin <i>Mus musculus</i>
Aktin down	ACGCAGCTCATTGTAGAAG	

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von TIB MOLBIOL GmbH, Berlin synthetisiert.

### 3.1.10 Antikörper

In Tabelle Tab. 2 bis Tab. 5 sind für Durchflusszytometrie, Western Blotting, *in vivo/ in vitro* Depletion, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz benutzten Antikörper aufgeführt.

Tab. 2: Antikörper für Durchflusszytometrie

Spezifität	Klon	Konjugat	Herkunft
CD4 Ratte-anti-Maus (R $\alpha$ M)	RM4-5	PerCP	BD Pharmingen™, Heidelberg
	L3T4	PE	
CD8 $\alpha$ R $\alpha$ M	53-6.7	PerCP	BD Pharmingen™, Heidelberg Caltag Laboratories, GmbH, Hamburg
	5H10	APC	
CD19	MB19-1	PE	eBioscience, San Diego, USA
CD25 R $\alpha$ M	PC61	PE	eBioscience, San Diego, USA
CD44 R $\alpha$ M	IM7	Biotin	eBioscience, San Diego, USA
CD62L R $\alpha$ M	Mel-14	FITC	eBioscience, San Diego, USA
CD69 R $\alpha$ M	H1.2F3	PE	eBioscience, San Diego, USA
TZR V $\alpha$ 2 R $\alpha$ M	B20.1	FITC	BD Pharmingen™, Heidelberg
		PE	
IL-2 R $\alpha$ M	JES6-5H4	PE	eBioscience, San Diego, USA
IL-4 R $\alpha$ M	11B11	PE	BD Pharmingen™, Heidelberg
IFN- $\gamma$ R $\alpha$ M	XMG1.2	APC	BD Pharmingen™, Heidelberg
Foxp3 R $\alpha$ M/Rat	FJK-16s	APC	eBioscience, San Diego, USA
MHC-I R $\alpha$ M	34-1-2S	FITC	eBioscience, San Diego, USA
Streptavidin-anti-Biotin		APC	eBioscience, San Diego, USA

Tab. 3: Antikörper zur Depletion

Spezifität	Klon	Konjugat	Herkunft
CD62L R $\alpha$ M	Mel-14	unkonjugiert	Prof. Dr. H.W. Mittrücker
IL-4 Ziege-anti-Maus	Polyklonal	unkonjugiert	R&D Systems, Wiesbaden

Tab. 4: Antikörper für Western Blot

Spezifität	Klon	Konjugat	Herkunft
Kaninchen-anti-Ovalbumin	Polyklonal	unkonjugiert	USbiological, Swampscott, USA
Ziege-anti-Kaninchen	Polyklonal	Peroxidase	Dianova, Hamburg

Tab. 5: Antikörper für Immunhistochemie/Immunfluoreszenz

Spezifität	Klon	Konjugat	Herkunft
Kaninchen-anti-Ovalbumin	Polyklonal	unkonjugiert	Chemicon, Temecula, USA
CD3 Kaninchen-anti-Maus	Polyklonal	unkonjugiert	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Foxp3 RαM/Ratte	FJK-16s	unkonjugiert	eBioscience, San Diego, USA
Kaninchen-anti-aktive Caspase 3 (ASP175)	Polyklonal	unkonjugiert	Cell Signaling, Danvers, USA
CD4 RαM	RM 4-5	unkonjugiert	eBioscience, San Diego, USA
CD8α RαM	Ly-2	unkonjugiert	eBioscience, San Diego, USA
Esel-anti-Kaninchen	Polyklonal	Biotin	Dianova, Hamburg
Kaninchen-anti-Ratte	Polyklonal	unkonjugiert	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Ziege-anti-Rat	Polyklonal	Alexa Fluor 555	Invitrogen, Karlsruhe

### 3.1.11 Versuchstiere

Die Zucht und Haltung der Mäuse erfolgte unter spezifisch-pathogenfreien Bedingungen. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden männliche und weibliche Tiere der in Tab. 6 aufgeführten Mausstämmen verwendet.

Tab. 6: Mausstämmen

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
C57Bl/6	Wildtyp (H-2 <sup>b</sup> )	Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin
OT-I (Hogquist, et al., 1994)	Transgener TZR, spezifisch für OVA <sub>257-264</sub> im Kontext von H-2 <sup>b</sup>	BfR, Berlin
OT-II (Barnden, et al., 1998)	Transgener TZR, spezifisch für OVA <sub>323-339</sub> im Kontext von H-2 <sup>b</sup>	BfR, Berlin
Rag1 <sup>-/-</sup> OT-I	Defizienz im <i>RAG1</i> Gen, transgener TZR, spezifisch für OVA <sub>323-339</sub> im Kontext von H- 2 <sup>b</sup>	Prof. Dr. Thomas Blankenstein, Berlin; eigene Zucht in der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) Charité, Berlin
B6.129-B2m <sup>tm1Jae</sup> N12 (Zijlstra, et al., 1990)	Störung des Gens für β2-Mikroglobulin, dadurch Defizienz in der Oberflächenexpression von MHC-I	Taconic Farms Inc., Germantown, USA
TF-OVA	Transgene Expression von membran- gebundenem OVA <sub>139-385</sub> unter TF-Promotor	eigene Zucht (FEM)

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
ASBT-OVA	Transgene Expression von membran-gebundenem OVA <sub>139-385</sub> unter ASBT-Promotor	eigene Zucht (FEM)
DEREG (Lahl, et al., 2007)	Transgene Expression des Fusionsprotein eGFP/humaner Diphtherie-Toxin-Rezeptor unter Foxp3-Promotor	Prof. Dr. Sparwasser und Prof. Dr. Hühn, Zentrum für Infektionsbiologie, Hannover
TF-OVAxDEREG		eigene Zucht (FEM)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.1.1 RNA-Extraktion

Die Isolation von RNA erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet, und folgende Organe wurden isoliert: Leber, Milz, Thymus, Niere, Testis, Lunge und Ileum. Die isolierte RNA wurde in RNase freiem Wasser oder Elutionspuffer aufgenommen und bei -80°C gelagert.

#### 3.2.1.2 Konzentrationsbestimmung von RNA

Durch die Messung der optischen Dichte (OD) mittels eines Spektrophotometers bei einer Wellenlänge von 260nm und 280nm kann sowohl die RNA-Konzentration als auch deren Reinheit bestimmt werden. Zur Berechnung der Konzentration verwendet man folgende Formel  $(OD)_{260nm} = 1$ , dabei entspricht 1  $OD_{260nm}$  40µg/ml RNA. Proteine erreichen ihr Absorptionsmaximum bei 280nm. Bildet man den Quotienten aus  $OD_{260}/OD_{280}$  nm sollte dieser für eine reine RNA-Präparation zwischen 1,6 und 1,8 liegen.

#### 3.2.1.3 DNase Verdau

Um eine Kontamination der RNA-Präparation mit genomischer DNA zu vermeiden, wurde ein Teil aller Proben vor der reversen Transkription mit DNaseI (Invitrogen) verdaut. Dazu wurde 1µg der RNA mit 1µl DNase (1U/µl), 4µl 10x DNase Puffer und DEPC H<sub>2</sub>O für 15min bei RT inkubiert. Durch Inaktivierung der DNase mit 25 mM EDTA und Inkubation für 10min bei 65°C wurde die Reaktion abgestoppt.

### 3.2.1.4 Reverse Transkription (RT-PCR)

Mit der Invitrogen™ Cloned AMV Reversen Transkriptase (Cloned AMV First-Strand Synthesis Kit, Invitrogen) wurde die Synthese der zur RNA komplementären DNA-Stränge (cDNA) mit Hilfe von Oligo(dT)<sub>50</sub>-Primern nach Angaben den Herstellers durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden 100ng, der aus den Geweben isolierten und DNase behandelten RNA verwendet. Die eingesetzte Reverse Transkriptase enthält bereits eine RNaseH Aktivität. Nach einer Inkubation für 50min bei 50°C wurde die Reaktion durch Inkubation bei 85°C für 5 min abgestoppt, und die Proben wurden bei -20°C gelagert.

### 3.2.1.5 Isolation von genomischer DNA aus Schwanzspitzenbiopsien

Zur Absicherung der Anwesenheit des Transgens in ASBT-OVA, TF-OVA und TF-OVAxDEREG Mäusen wurde die genomische DNA der Jungtiere dieser Mausstämmen vor der Verwendung überprüft. Die Isolation genomischer DNA erfolgte aus Schwanzspitzenbiopsien der Mäuse durch Lyse der Biopsien in 200µl Schwanzlysepuffer mit 0,8mg/ml Proteinase K. Die Proben wurden für 1h bei 55°C geschüttelt, bis sich das Gewebe vollständig aufgelöst hatte. Nach Inaktivierung der Proteinase K durch Inkubation bei 95°C für 5min wurden die Proben mit ddH<sub>2</sub>O auf 1ml aufgefüllt und direkt für die PCR verwendet oder bei -20°C gelagert.

### 3.2.1.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die routinemäßig durchgeführte qualitative PCR der aus den Schwanzspitzenbiopsien isolierten genomischen DNA mit Primern spezifisch für einen Teil der Ovalbuminsequenz (OVA up, OVA down), diente dem Nachweis des transgenen Konstruktes bei den im Versuch verwendeten ASBT-OVA, TF-OVA und TF-OVAxDEREG Mäusen.

Des Weiteren wurde die PCR zum Nachweis der Expression des Konstruktes in verschiedenen Geweben durchgeführt. Um verbleibende DNA-Kontamination in der RNA Präparation und somit falsch-positive Signale auszuschließen, wurde die PCR zum einen mit cDNA Proben durchgeführt, zum anderen mit RNA-Proben ohne reverse Transkription, welche nur mit DNase verdaut wurden. Die PCR wurde mit Primern für Ovalbumin (OVAup, OVAdown) und β-Aktin (Aktin up, Aktin down) durchgeführt.

Der verwendete Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen) enthielt bereits Taq DNA Polymerase, Salze, MgCl<sub>2</sub>, und dNTP's. Es wurden jeweils 10µM Primer (Sense, Antisense) und 10ng der entsprechende Menge Matrize hinzugefügt. Die PCR-Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 25 µl angesetzt.

Für alle PCR Reaktionen wurde folgendes Standardprogramm verwendet:

- |                           |      |        |
|---------------------------|------|--------|
| 1. Initiale Denaturierung | 94°C | 2 min  |
| 2. Denaturierung          | 94°C | 30 sek |

3. Primeranlagerung	55°C	30 sek
4. Elongation	72°C	1 min
5. Zyklen (2. bis 4.)	30x	
6. finale Elongation	72°C	10 min
7. Kühlung	4°C	

### **3.2.1.7 Agarosegelelektrophorese**

Agarosegelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von DNA-Molekülen entsprechend ihrer Größe. Die PCR-Produkte wurden mit 5x Ladepuffer versetzt, und 20µl des PCR-Produktes wurden auf einem 1,5%igem Agarosegel, welchem nach dem Aufkochen der Agarose in 1x TAE-Puffer Ethidiumbromidstammllösung (4µl/100 ml) zugegeben wurde, bei einer Spannung von 100V aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde ebenfalls 1x TAE-Puffer verwendet. Anschließend wurde die DNA auf einem Transilluminator durch UV-Licht sichtbar gemacht und das Ergebnis mit einem Foto dokumentiert.

## **3.2.2 Proteinbiochemische Methoden**

### **3.2.2.1 Herstellung von Proteinlysaten**

Zum Nachweis der Ovalbuminexpression wurden aus Leber, Milz, Thymus, Niere, Testis, Lunge, Ileum und Jejunum Zellysate hergestellt. Dazu wurden die Gewebe aus der Maus isoliert und in eiskaltem Zellyse-Puffer durch Ultraschall (Bandelin Sonifier, 10sec, 80% output) auf Eis aufgeschlossen. Proteasen wurden durch Zugabe einer Protease-Inhibitor-Cocktail Tablette (1 Tablette/10ml Zellyse-Puffer, Roche) inhibiert. Verbleibende Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation sedimentiert (12000g, 4°C, 10min) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### **3.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Lysaten erfolgte photometrisch nach Lowry mit DC Protein Assay Kit (BioRad) nach Angaben des Herstellers. Die Auswertung erfolgte in 96-well-Platten bei 750 nm mit Hilfe eines EL800 Universal Microplate Reader. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer Eichkurve einer definierten Menge BSA-Lösung bestimmt.

### **3.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot**

Denaturierte Proteine können mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Nach der SDS-PAGE können durch den elektrophoretischen Transfer der Proteine auf eine Membran einzelne Proteine spezifisch mit Antikörpern nachgewiesen werden. Durch einen an das Enzym Horseradish-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper und Zugabe des Enzymsubstrates, kann bei einer erfolgten Bindung das Enzym sein Substrat zu Chemolumineszenz umsetzen. Diese kann auf Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

Das 12,5%ige Trenngel und 5,6%ige Sammelgel wurden in dem Elektrophorese System für Minigele (BioRad) gegossen. 80µg der Proteinlysate wurden mit 1/5 Volumen Laemmli-Probenpuffer versetzt, bei 95°C für 5 min denaturiert, in die Taschen des Sammelgels aufgetragen und bei einer Spannung von 100V (Sammelgel) und anschließend 200V (Trenngel) elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard wurden 10µl SeeBlue® Plus2 Pre-Stained (Invitrogen) eingesetzt.

Durch Western Blotting wurden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine in einer Nass-Blot-Kammer für Minigele (BioRad) bei 100V für 60 min unter Eiskühlung auf eine Polyvinylidene-fluoride-Membran (PVDF, Millipore) übertragen. Anschließend wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer freier Proteinbindungsstellen für 1h bei RT mit 5% Magermilchpulver in PBS/0,1% Tween geblockt. Zum Nachweis von Ovalbumin wurde anti-OVA Antikörper (USbiological, 1:1000 in 5% Magermilchpulver in PBS/0,1% Tween) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Waschpuffer (3x 15 min) und Inkubation für 1h bei RT mit dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen-HRP (Dianova, 1:30.000 in 5% Magermilchpulver in PBS/0,1% Tween) wurde die Membran nach erneutem Waschen (3x 15min) für 1min mit den Komponenten des Enhanced Chemiluminescence Detection Kit (Perkin Elmer) nach Angaben des Herstellers bedeckt. Anschließend wurde auf die Membran in einer Fotokassette ein Röntgenfilm (Agfa) aufgelegt und der Film nach angemessener Expositionszeit entwickelt.

## **3.2.3 Tierexperimentelle Methoden**

### **3.2.3.1 Isolation von Zellen aus Mausgewebe**

Um Organe zu entnehmen, wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und die Oberfläche der Tiere mit 75% igem Ethanol besprüht. Wurden Zellen für eine anschließende Kultur isoliert, dann erfolgte die weitere Präparation unter einer Sterilbank. Während der Zellisolation wurden die Zellen auf Eis gekühlt und, wenn nicht anders angegeben, bei 4°C zentrifugiert

#### 3.2.3.1.1 Isolation von Zellen aus der Milz

Die Milz wurde entnommen und mit Hilfe eines Spritzenkolbens und unter ständigem Spülen mit PBS/BSA durch einem Zellsieb (70µm) in ein 50ml Röhrchen zu einer Einzelzellsuspension zerkleinert. Die Suspension wurde für 8min bei 1200rpm zentrifugiert und anschließend für 5min bei RT mit Erythrozyten-Lyse-Puffer inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde das Zellpellet in einem angemessenen Volumen PBS/BSA aufgenommen, erneut durch ein Zellsieb filtriert und die Zellzahl bestimmt.

#### 3.2.3.1.2 Isolation von Zellen aus den Lymphknoten

Zur Isolation der Zellen aus einzelnen Lymphknoten, z.B. für Proliferations- und *in vivo* Zytolyseversuche wurden die inguinalen, mesenterialen und Leberlymphknoten entnommen und in separate Vertiefungen einer 6-well-Platte in PBS/BSA überführt. Die Lymphknoten wurden separat mechanisch mit Objektträgern zerrieben und die Einzelzellsuspension in Reaktionsgefäßen gesammelt. Nach Waschen der Zellsuspension (6min, 3200rpm) wurde das Zellpellet in 1ml PBS/BSA resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

#### 3.2.3.1.3 Isolation von intrahepatischen Lymphozyten

Der Peritonealraum wurde geöffnet und die Leber freipräpariert. Mit einer 25xG-Kanüle und einer 10ml-Spritze wurde die Leber durch die Portalvene mit 10ml PBS/BSA gespült. Die Leber wurde herausgelöst und die Gallenblase entfernt. Anschließend wurde die Leber mit einer Schere in mehrere Stücke zerkleinert und mit Hilfe eines Spritzenkolbens und unter ständigem Spülen mit PBS/BSA durch einem Zellsieb (70µm) in ein 50ml Röhrchen zerrieben. Um Hepatozyten abzutrennen, wurde die Suspension für 3min bei 300rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches 50ml Röhrchen überführt und für 8min bei 1200rpm pelletiert. Zur Isolation der intrahepatischen Lymphozyten wurde das Pellet gelöst und in 5ml 40%iges Percoll resuspendiert. Diese Suspension wurde in einem 15ml Röhrchen auf 4ml 70%iges Percoll überschichtet und ohne Bremse für 20min bei 2000rpm und RT zentrifugiert. Die oberste Schicht wurde verworfen, die Interphase abgenommen, mit PBS/BSA gewaschen und noch vorhandene Erythrozyten durch Inkubation für 5min bei RT mit Erythrozyten-Lyse-Puffer lysiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Zellsuspension in PBS/BSA resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

#### 3.2.3.1.4 Isolation von Zellen aus peripherem Blut

Nach Narkose der Mäuse durch Ketamin/Xylazin (*i.p.*) wurde durch Punktion der Schwanzvene oder des retrobulbären Venenplexus mittels Hämatokritkappillare etwa 10µl Blut entnommen und in einem Reaktionsgefäß mit PBS/ 0,5mM EDTA vermischt. Die Zellen wurden zentrifugiert (6min, 3200rpm)



das Pellet gelöst und die Erythrozyten anschließend für 5min bei RT mit Erythrozyten-Lyse-Puffer lysiert. Nach der Zugabe von 1ml PBS/BSA wurden die Zellen erneut zentrifugiert und in PBS/BSA resuspendiert. Danach wurden, wenn benötigt Oberflächenantigene oder intrazelluläre Antigene gefärbt wie in 3.2.6 beschrieben.

#### 3.2.3.1.5 Isolation von Zellpopulationen durch magnetische Zellseparation

Zur Isolation von Lymphozyten und anschließender MACS-Zellsortierung wurden Milz und/oder inguinale, mesenteriale, axilläre, brachiale, superficial cervicale, lumbale und sakrale Lymphknoten entnommen und zusammen in einer Zellkulturschale mit MACS-Puffer gesammelt. Die Aufarbeitung erfolgte wie unter 3.2.3.1.1 für die Milz beschrieben jedoch unter der Verwendung von MACS-Puffer. Mit Hilfe der MACS-Technologie (MACS: magnetic activated cell sorting) können einzelne Zellpopulationen aus einem Zellgemisch isoliert werden. Diese Methode basiert auf superparamagnetischen Partikeln (MicroBeads), welche an Antikörper gekoppelt sind. Die epitopspezifischen Antikörper können direkt mit MicroBeads konjugiert sein oder ein unkonjugierter Primärantikörper bindet epitopspezifisch und mittels eines markierten Sekundärantikörpers werden die Zellen aus der Suspension isoliert. Dazu wird die Zellsuspension mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert und in einem Magnetfeld auf eine mit ferromagnetischer Matrix gefüllte Säule gegeben. Zellen die mit MicroBeads markiert sind, werden im magnetischen Feld zurückgehalten, und unmarkierte Zellen passieren die Säule. Durch ein Entfernen der Säule aus dem Magneten können auch die markierten Zellen gesammelt werden. Mit Hilfe dieser Methode können Zellen aufgrund ihrer Oberflächenmoleküle positiv oder negativ aus einem Zellgemisch selektiert werden.

Die Isolation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte mit dem CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) durch Depletion der CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> Zellpopulationen nach Anleitung des Herstellers. Die Reinheit der so isolierten Zellpopulation betrug >95% CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die Aufreinigung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte mit dem CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) durch Depletion der CD4<sup>-</sup> Zellen nach Angaben des Herstellers. Die Reinheit der isolierten Zellpopulation betrug >85% CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Für einige Versuche wurden die CD8<sup>+</sup> T-Zellen und die CD4<sup>+</sup> T-Zellen weiter mit  $\alpha$ CD62L MicroBeads in CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>high</sup> bzw. CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>high</sup> Zellen aufgereinigt. Die Aufreinigung der Zellpopulationen erfolgte manuell über LS- oder MS-Säulen im MidiMACS<sup>TM</sup> bzw. MiniMACS<sup>TM</sup> Separator Magneten.

#### 3.2.3.2 Bestimmung der Zellzahl

10 $\mu$ l der Zellsuspension wurden in einem angemessenen Volumen mit 0,4%iger Trypanblaulösung (v/v in PBS) verdünnt. 10 $\mu$ l dieser Verdünnung wurden in eine Neubauer Zählkammer gegeben und die Zahl der lebenden (ungefärbten) Zellen in den 4 großen Außenquadraten ermittelt. Die Zellzahl berechnet sich folgendermaßen: Zellzahl/ml = (gezählte Zellen / 4) x Verdünnungsfaktor x 10<sup>4</sup>.

### 3.2.3.3 Adoptiver Transfer von Zellen

Zum adoptiven Transfer der Zellen wurden die Mäuse mit Ketamin/Xylazin (*i.p.*) narkotisiert und anschließend die in PBS gelöste Zellsuspension in einem Volumen von 200µl (*i.v.*) in die Empfängermäuse injiziert. Sofern nicht anders angegeben wurden  $4 \times 10^6$  Zellen/Maus transferiert.

### 3.2.3.4 Herstellung von Knochenmarkchimären

Die Empfängermäuse wurden mit 10,5 Gy in einer Gammabestrahlungsanlage Biobeam 2000 lethal bestrahlt. Einen Tag später wurde das Knochenmark der Spendertiere isoliert. Dazu wurden Ober- und Unterschenkelknochen der Spendermäuse gründlich von Gewebe befreit, entnommen und am Kniegelenk getrennt. Mit einer 25xG-Kanüle und einer Spritze wurde das Mark aus den Knochen gespült und in einer Schale mit PBS/BSA gesammelt. Durch Resuspendieren wurden die Zellen vereinzelt, filtriert (Zellsieb, 70µm) und nach der Lyse der Erythrozyten die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen.  $4-6 \times 10^6$  Spender-Knochenmarkszellen wurden intravenös in die Empfängertiere injiziert. Das Trinkwasser der Empfängermäuse wurde eine Woche vor Bestrahlung und für 6 Wochen nach dem Knochenmarkstransfer mit 0,4% (v/v) Antiinfektivum (Baytril®) ergänzt. Vor Versuchsbeginn wurde den Knochenmarkchimären zur Überprüfung der MHC-I Defizienz Blut entnommen (siehe 3.2.3.1.4), und durch Färbung von MHC-I, CD8, CD4 sowie CD19 mittels Durchflusszytometrie das Fehlen der entsprechenden Oberflächenantigene überprüft. Etwa 8 bis 10 Wochen nach dem Knochenmarkstransfer wurden die Chimären für die Experimente eingesetzt.

### 3.2.3.5 Splenektomie

Die Mäuse wurden durch *i.p.* Injektion mit Ketamin/Xylazin narkotisiert und unter der Sterilbank seitlich fixiert. Nach Desinfektion wurde mit sterilen Instrumenten laparotomiert und die Milz aufgesucht. Anschließend wurde diese etwas nach außen gezogen und nach Ligation der zu- und abführenden Gefäße entfernt. Der Schnitt wurde mit Einzelstichnähten verschlossen, die oberste Hautschicht mit Metallklammern adaptiert und die Tiere im Anschluss für eine Woche mit 2mg/ml Paracetamolösung im Trinkwasser analgetisch behandelt. 2 Wochen später wurden die Tiere für Versuche verwendet.

#### 3.2.3.5.1 Hemmung der Migration

##### *Behandlung mit FTY*

In einigen Versuchen wurden splenektomierte Tiere zusätzlich mit der Substanz FTY720 behandelt. Die *i.p.* Injektion von 1mg/kg erfolgte 6h vor sowie einen und drei Tage nach Zelltransfer. Die Kontrollgruppe erhielt zu allen Zeitpunkten eine Injektion mit Trägersubstanz (Ethanol/ PBS 1:4). Die Kontrolle der Retention der Lymphozyten in den Lymphknoten erfolgte vor Versuchsbeginn sowie zu

den angegebenen Zeitpunkten während des Versuches im peripheren Blut durch Färbung von CD3 mittels Durchflusszytometrie.

#### *Behandlung mit CD62L Antikörper*

In einigen Versuchen wurden splenektomierte Tiere zusätzlich mit CD62L Antikörper behandelt. Die *i.p.* Injektion von 250µg Antikörper/Maus erfolgte 4h vor dem Zelltransfer. Die Kontrollgruppe erhielt eine Injektion mit PBS.

#### **3.2.3.6 Depletion Foxp3<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> Zellen in TF-OVAXDEREG Mäusen**

Durch die *i.p.* Injektion von 1µg/Maus Diphtherie Toxin (DT) gelöst in PBS wurden Foxp3<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> Zellen systemisch depletiert. Die Injektion von DT bzw. PBS (Kontrolltiere) erfolgte 18h vor sowie einen und drei Tage nach Transfer von 4x10<sup>6</sup> Rag1<sup>-/-</sup>OT-I Zellen. Die Kontrolle der Depletion erfolgte über den gesamten Versuchszeitraum (Tag 0, 2 und 4) im peripheren Blut durch Färbung von CD4 und Foxp3 mittels Durchflusszytometrie. Es wurde zusätzlich die Färbung für Foxp3-APC durchgeführt, da ein geringer Anteil Foxp3<sup>+</sup>GFP<sup>-</sup> Zellen vorhanden ist, welcher nach der Depletion der GFP<sup>+</sup> Zellen mit DT expandiert.

#### **3.2.3.7 *In vivo* Zytolyse Assay**

Für *in vivo* Zytolyse Versuche wurden am Tag 0 die angegebene Zellzahl und Zellart *i.v.* in die Empfängermäuse transferiert. 6 Tag nach dem Zelltransfer wurden aus C57Bl/6 Mäusen Milzzellen isoliert wie unter 3.2.3.1.1 beschrieben. Die Zellsuspension wurde in zwei Teile aufgeteilt und entweder mit 7,5µM CFSE (CFSE<sup>high</sup>) bzw. 0,75µM CFSE (CFSE<sup>low</sup>) wie in 3.2.6.4 beschrieben markiert. Während die CFSE<sup>high</sup> Population anschließend in RPMI mit OVA<sub>257-264</sub> (1µM) resuspendiert wurde, wurde der CFSE<sup>low</sup> Anteil nur in RPMI resuspendiert. Im Anschluss an eine Inkubation von 60min bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen dreimal mit RPMI gewaschen, die Zellzahl bestimmt und zu gleichen Teilen gemischt. 8x10<sup>6</sup> Zellen wurden in die zuvor behandelten Mäuse *i.v.* injiziert. Als Kontrollgruppe dienen unbehandelte Mäuse. 5h später wurden Zellen aus inguinalen bzw. Leberlymphknoten sowie Leber und Milz isoliert und im Durchflusszytometer analysiert. Sind in den Empfängermäusen zytolytisch aktive Zellen vorhanden, welche die transferierten CFSE<sup>high</sup> markierten und mit SIINFEKL beladenen Splenozyten antigenspezifisch lysieren, dann nimmt der Anteil an CFSE<sup>high</sup> markierten und mit Peptid beladenen Zellen im Verhältnis zu den CFSE<sup>low</sup> markierten Zellen ab. Die Kontrollmaus ohne Vorbehandlung wird verwendet, um das Mischungsverhältnis und spontane bzw. unspezifische Lyse zu relativieren. Die spezifische Lyse wurde mit folgender Formel berechnet:  $100 \times [1 - (\% \text{CFSE}^{\text{low}}_{\text{unbehandelt}} / \% \text{CFSE}^{\text{high}}_{\text{unbehandelt}}) / (\% \text{CFSE}^{\text{low}}_{\text{behandelt}} / \% \text{CFSE}^{\text{high}}_{\text{behandelt}})]$ .

### 3.2.4 *In vitro* Polarisierung von CD4<sup>+</sup> Effektorzellen

Aus den Lymphknoten von OT-II Mäusen wurden naive CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>high</sup> T-Zellen durch MACS Selektion isoliert. Als APZ wurden Zellen aus der Milz verwendet. Nach der Isolation der Milzzellen wurden diese mit 30 Gy mittels einer Cäsiumquelle (Typ OB29/4/9503-11, Institut für Transfusionsmedizin, Charité, CVK) bestrahlt. Naive CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>high</sup> T-Zellen wurden im Verhältnis von 1:3 mit den APZ für 6 Tage in komplett-RPMI ergänzt mit rekombinatem murinen IFN- $\gamma$  (20ng/ml) und IL-12 (5ng/ml) sowie anti-IL-4 Antikörper (5 $\mu$ g/ml) und OVA<sub>323-339</sub> (5 $\mu$ g/ml) kultiviert. Am Tag 3 der Kultur wurden die Zellen mit frischem komplett-RPMI versorgt. Vor der Injektion wurden die Zellen mit einem 24%igem Nycodenz-Gradienten aufgereinigt. Dazu wurden die Zellen geerntet, in 1ml komplett-RPMI resuspendiert und mit 30% Nycodenz vermischt. Die Zellsuspension wurde unter 2ml komplett-RPMI unterschichtet und bei 2500rpm und RT für 20min ohne Bremse zentrifugiert. Die Interphase, bestehend aus lebenden Zellen, wurde geerntet, mit PBS gewaschen, und die Zellzahl wurde bestimmt. Ein Teil der Zellen wurde wie in 3.2.5 beschrieben restimuliert und auf IFN- $\gamma$  und IL-4-Produktion getestet. 60 bis 90% der für die Versuche verwendeten Zellen produzierten nach Restimulation IFN- $\gamma$ , weniger als 1% der Zellen produzierte IL-4.

### 3.2.5 T-Zell-Restimulation

Um Zellen phänotypisch zu charakterisieren und zur Zytokinexpression zu aktivieren, wurden Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem adoptiven Transfer aus den entsprechenden Organen isoliert und *in vitro* restimuliert. Sechs Tage nach dem Transfer von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus der Leber intrahepatische Lymphozyten isoliert, und 2x10<sup>6</sup> Zellen/ml wurden in komplett-RPMI mit 20nM PMA und 1 $\mu$ M Ionomycin, OVA<sub>257-264</sub> (10 $\mu$ g/ml) oder ohne weiteren Zusatz resuspendiert und für 2h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Für weitere 4h wurde Brefeldin A (5 $\mu$ g/ml) hinzugefügt, um eine Sekretion der Zytokine zu verhindern.

Zur phänotypischen Analyse der adoptiv transferierten OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowie der *in vitro* polarisierten OT-II CD4<sup>+</sup> Effektorzellen wurden drei Tage nach dem Transfer Zellen aus Leber und Milz isoliert bzw. sechs Tage nach Beginn der Zellkultur Zellen geerntet. 2x10<sup>6</sup> Zellen/ml wurden in komplett-RPMI mit 20nM PMA und 1 $\mu$ M Ionomycin oder ohne weiteren Zusatz resuspendiert und für 1 Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Für weitere 3h wurde die Zellen mit Brefeldin A (5 $\mu$ g/ml) inkubiert.

Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen geerntet, mit PBS/BSA gewaschen, extra- und intrazellulär mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert.

### **3.2.6 Durchflusszytometrie und Färbung von Zellen**

#### **3.2.6.1 Durchflusszytometrie und Auswertung**

Zellen lassen sich aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften, wie Granularität und Größe, durch Markierung mit fluorochromgekoppelten Antikörpern in Abhängigkeit der Expression von intrazellulären Proteinen oder Oberflächenmolekülen und durch die Expression von fluoreszenten Proteinen mit Hilfe eines Durchflusszytometers (fluorescence activated cell sorting, FACS) charakterisieren. Das Gerät BD FACSCalibur™ ermöglicht die gleichzeitige Analyse von Vorwärtstreulicht (Größe), Rechtwinkelstreulicht (Granularität) und vier Fluoreszenzparametern. Dadurch können einzelne Zellen und Zellpopulationen in einem Zellgemisch charakterisiert und unterschieden werden.

Die Aufnahme und Auswertung der Daten erfolgte mit einem FACSCalibur™ Durchflusszytometer (BD) und der Software CellQuestPro Version5.2.

#### **3.2.6.2 Färbung von Oberflächenantigenen**

Für Oberflächenfärbungen mit direkt mit einem Fluorochrom gekoppeltem Antikörper wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in PBS/BSA in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C und 3200rpm für 6min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet gelöst und die Zellen mit den jeweiligen Antikörpern (Verdünnung 1:100 bis 1:200) für 20min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach Waschen mit 1ml PBS/BSA wurden die Zellen in 400µl PBS/BSA aufgenommen. Falls ein biotinylierter Primäantikörper verwendet wurde, dann erfolgte nach dem Waschen ein zweiter Inkubationsschritt wiederum für 20min im Dunkeln auf Eis mit einem an Streptavidin-gekoppelten Fluorochrom (Verdünnung 1:200). Nach erneutem Waschen mit 1ml PBS/BSA (4°C, 3200 rpm, 6min) wurden die Zellen in 400µl PBS/BSA resuspendiert. Vor der Messung am Durchflusszytometer wurde die Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen überführt und bis zur FACS-Messung im Dunkeln gelagert. Die verwendeten Antikörper sind in Tab. 2 aufgeführt.

#### **3.2.6.3 Färbung von intrazellulären Antigenen**

Folgte nach der Oberflächenfärbung eine intrazelluläre Färbung, dann wurden die Zellen nach dem Waschen mit 1ml PBS als nächstes mit 1% PFA für 10min bei RT im Dunkeln fixiert, anschließend mit 1ml PBS gewaschen und im nachfolgenden Schritt in 1ml PBS/0,5% Saponin permeabilisiert, erneut zentrifugiert und schließlich für 20min auf Eis im Dunkeln mit dem Antikörper gelöst in PBS/0,5% Saponin inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS/0,5% Saponin wurden die Zellen in PBS/BSA resuspendiert und zur Analyse im Durchflusszytometer in FACS-Röhrchen überführt.

Für die Versuche zur Restimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden die Zellen nach der Oberflächenfärbung mit Hilfe des BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution von BD Biosciences nach Angaben des Herstellers behandelt.

Für die intranukleare Färbung mit Foxp3 Antikörper wurde das Foxp3 Staining Buffer Set von eBioscience nach Anleitung des Herstellers verwendet. Dazu wurden die Zellen nach der Färbung der Oberfläche mit 1ml PBS/BSA gewaschen und in 1ml Fix/Perm-Puffer resuspendiert und für mindestens 45min auf Eis im Dunklen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Permeabilisierungspuffer gewaschen und für 30min auf Eis im Dunkeln mit Foxp3 Antikörper gelöst in Permeabilisierungspuffer inkubiert. Die Zellen wurden nach der Inkubation nochmals mit 1ml Permeabilisierungspuffer gewaschen und dann für die Analyse in 400µl PBS/BSA resuspendiert.

#### 3.2.6.4 CFSE-Markierung von Zellen

CFDA-SE (5-,6-Carboxyfluorescein-diazetat-succinimidylester) ist eine farblose Substanz, von der nach passiver Aufnahme in die Zelle im Zytoplasma durch zelleigene Esterasen die Azetatgruppen abgespalten werden. Dadurch entsteht grün fluoreszierender Carboxyfluorescein succinimidylester (CFSE), dessen Estergruppen mit intrazellulären Aminen reagieren und der somit in der Zelle zurückbehalten wird. Die Markierung von Zellen mit CFSE und anschließender adoptiver Transfer in Mäuse ermöglicht es, das Migrationsverhalten der injizierten Zellen durch Analyse im Durchflusszytometer zu verfolgen. Außerdem wird bei der Zellteilung der Farbstoff zu gleichen Teilen auf die Tochterzellen verteilt. Dadurch lässt sich die Proliferation der injizierten Zellen durch Analyse im Durchflusszytometer beobachten.

Für *in vivo* Proliferations-Versuche wurden  $1 \times 10^7$  Zellen/ml RPMI mit 15µM CFSE unter gelegentlichem Mischen für 10min bei 37°C inkubiert, anschließend wurde mit frischem RPMI/1% FCS die Reaktion abgestoppt, die Zellen wurden gewaschen und erneut die Zellzahl bestimmt.

Für *in vivo* Zytolyseversuche wurden ein Teil (CFSE<sup>high</sup>) der Splenozyten mit 7,5µM CFSE inkubiert, während der zweite Teil (CFSE<sup>low</sup>) mit einer niedrigeren Dosis CFSE (0,75µM) markiert wurde.

#### 3.2.7 Bestimmung von Alaninaminotransferase und Bilirubin im Plasma

Das Enzym Alaninaminotransferase (ALT) findet man in hoher Konzentration im Zytoplasma von Hepatozyten. Es katalysiert unter anderem die Übertragung der Aminogruppe bei der Reaktion von L-Alanin und α-Ketoglutarat zu Pyruvat und L-Glutamat (Gluconeogenese). Erhöhte ALT-Werte können im Blut bei Schädigung der Hepatozyten durch akute oder chronische Hepatitis, autoimmune Hepatitis, Cholangitis oder toxische Schädigung durch Alkohol, Medikamente oder andere Toxine gemessen werden. Im Vergleich dazu entsteht Bilirubin beim Abbau von Häm aus dem Hämoglobin alter Erythrozyten oder anderer hämhaltiger Proteine. Erhöhte Werte liegen z.B. bei Hepatitis, Cholestase oder Hämolyse vor.

Zur Bestimmung der ALT- und Bilirubin-Werte wurde den Mäusen nach Narkose mit Ketamin/Xylazin an den angegebenen Tagen durch Punktion des retrobulbären Venenplexus oder der Schwanzvene mit Hämatokritkappillaren Blut entnommen und in Lithium-Heparin beschichteten Gefäßen zur Plasmagewinnung mit Trenngel gesammelt. Durch Zentrifugation bei 8000 rpm bei RT für 10min wurden die Blutzellen vom Plasma getrennt. Das im Überstand befindliche Plasma wurde abgenommen und in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Analyse mittels eines Roche Modular Analyzers bei -20°C gelagert.

### **3.2.8 Immunhistochemische Methoden**

#### **3.2.8.1 Herstellung von Gewebeschnitten**

Wurden Leberproben für Gewebeschnitte in Paraffin entnommen, dann wurde die Leber mit 10ml PBS über die Portalvene perfundiert, entnommen und in 4% PFA für 24h fixiert. Anschließend wurden die Gewebeprobe in 70% Ethanol überführt und über Nacht in einer automatischen Einbettvorrichtung entwässert und in Paraffin eingebettet (Shandon Hypercenter XP Tissue Processor). Die Paraffinblöcke wurden vor dem Schneiden über Nacht bei -20°C gelagert, bevor an einem Mikrotom 4µm dicke Schnitte angefertigt wurden. Die Schnitte wurden anschließend über Nacht bei 37°C getrocknet und konnten am nächsten Tag für Färbungen verwendet werden.

Wurden Leberproben für Kryo-Gewebeschnitte entnommen, dann wurden Leberstücke nach der Perfusion in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Um Gefrierschnitte anzufertigen, wurden die Proben mit Tissue-Tek auf Aluminiumzylindern fixiert und an einem Kryostat bei -30°C in 8µm dicke Schnitte geschnitten. Die Schnitte wurden mit Glasobjektträgern aufgenommen und vor der Lagerung bei -80°C für 2 h bei Raumtemperatur getrocknet.

Wurden Schnitte für Immunhistochemie oder -fluoreszenz angefertigt, dann wurden sowohl Paraffin-, als auch die Kryogewebeschnitte auf Dako REAL™ Objektträger (Dako) aufgenommen. In allen anderen Fällen wurden SuperFrost® Plus Glasobjektträger (R. Langenbrinck) verwendet.

#### **3.2.8.2 Entparaffinieren von Paraffinschnitten**

Vor der Anfärbung der Paraffinschnitte wurden diese durch Inkubation in Roti®-Histol für 2x10 min entparaffiniert, und anschließend wieder über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert (jeweils 5 min Isopropanol, 90% Ethanol, 80% Ethanol, 70% Ethanol, 50% Ethanol, ddH<sub>2</sub>O).

### **3.2.8.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E)**

Die H&E-Färbung ist eine Übersichtsfärbung, bei welcher Zellkerne durch die Hämalaunlösung blau/violett und das Zytoplasma durch das Eosin rosa angefärbt wird. Die Färbung mit Hämalaunlösung erfolgte für 8min, mit anschließendem Spülen unter fließendem Leitungswasser und dann für 10 sec mit Eosinlösung (1% in ddH<sub>2</sub>O). Im Anschluss daran wurden die Schnitte erneut unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Zum Schluss wurden die Schnitte mit 37°C warmer Kaisers Glycingelatine eingebettet.

### **3.2.8.4 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz**

Nach der Entparaffinierung der Schnitte wurde sie für 2min in Citrat-Puffer (pH 6,0) im Schnellkopftopf gekocht, anschließend mit kaltem Wasser abgekühlt und mit Tris-Lösung (pH 7,4) gewaschen. Um unspezifische Antikörperbindung zu verhindern, wurden die Schnitte mit Peroxidase- oder Biotinblockierungsreagenz (Dako) behandelt.

Zur Detektion von Ovalbumin, Foxp3 und aktiver Caspase 3 wurden die Leberschnitte mit OVA-Antikörper (Chemicon, 1:200), Foxp3 Antikörper (FJK-16s, ebioscience, 1:100) bzw. anti-aktive-Caspase 3 Antikörper (Cell Signaling, 1:200) inkubiert. Mit Foxp3 Antikörper behandelte Schnitte wurden daraufhin zusätzlich mit Kaninchen-anti-Ratte Antikörper behandelt. Zum Nachweis wurde anschließend das EnVision Peroxidase Kit (Dako) nach Angaben des Herstellers verwendet und durch Inkubation mit Diaminobenzidine (DAB) als Chromogenem Substrat für 10min sichtbar gemacht.

Zur Detektion von CD3 wurden die Leberschnitte mit CD3 Antikörper (N1580, Dako, 1:300) und im Anschluss daran mit biotinyliertem Esel-anti-Kaninchen Sekundärantikörper (Dianova) und StreptavidinAP Kit (K0391, Dako) inkubiert, bevor die Reaktion mit Fast Red als Chromogen sichtbar gemacht wurde.

Nach dem Trocknen der Gefrierschnitte wurden diese für 10min mit Aceton fixiert, bevor sie mit CD8 (Ly-2, ebioscience, 1:50) oder CD4 (RM 4-5 ebioscience, 1:50) Antikörper inkubiert wurden. Zur Sichtbarmachung wurden die Schnitte mit Ziege-anti-Ratte Alexa Fluor 555 (Invitrogen, 1:1500) inkubiert und die Zellkerne mit DAPI gegengefärbt, bevor sie in Floromount-G (Southern Biotech) eingebettet wurden.

Die immunhistochemische Färbungen an Paraffinschnitten, Immunfluoreszenz an Gefrierschnitten und fotografische Dokumentation wurden mit Hilfe von Simone Spieckermann und Prof. Dr. Christoph Loddenkemper durchgeführt.

### **3.2.8.5 TUNEL-Färbung**

Bei der Apoptose entstehen DNA-Fragmente und DNA-Strangbrüche mit freien 3'-Hydroxylenden. Bei der TUNEL (Terminal deoxynukleotidyl transferase - mediated dUTP Nick End Labelling) Methode werden diese durch das Enzym TdT (Terminale Desoxynukleotidyltransferase) mit



markierten Nukleotiden verknüpft. In dem verwendeten In situ Cell Death Detection Kit, TMR red (Roche), sind in die dUTP Nukleotide mit Tetramethyl Rhodamine (TMR) gekoppelt, und die markierte DNA ist im Fluoreszenzmikroskop aufgrund der roten Fluoreszenz sichtbar.

Leberparaffinschnitte wurden wie unter 3.2.8.2 beschrieben entparaffiniert, rehydriert und anschließend durch Inkubation bei RT für 8min in 0,1% Triton X-100 in 0,1% Citrat-Puffer (frisch hergestellt) permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit dem frisch angesetzten TUNEL Reaktionsgemisch (Enzymlösung und Markierungslösung 1:10) für 60 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ein Schnitt mitgeführt, welcher nur mit der Markierungslösung inkubiert wurde. Die Positivkontrolle wurde vor der Inkubation mit dem TUNEL Reaktionsgemisch mit DNaseI (Invitrogen, 1:50) für 15min in feuchter Kammer bei 37°C behandelt und danach mit PBS gespült. Anschließend wurden die Schnitte 3x mit PBS gespült und zur Anfärbung der Zellkerne für 2min mit DAPI-Lösung (1:1000) inkubiert, bevor nach erneutem Waschen die Schnitte mit Kaisers Glyceringelatine eingebettet wurden.

### **3.2.9 Statistische Auswertung**

Die Darstellung der Graphen und statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPadPrism und die Werte sind als Mittelwert mit Standardfehler (SEM) angegeben. Zur Berechnung der Signifikanzen wurden entweder der Mann-Whitney-Test oder der ungepaarte Student's t Test verwendet. (\* =  $p < 0,5$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Leberspezifische Expression von Ovalbumin in ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen

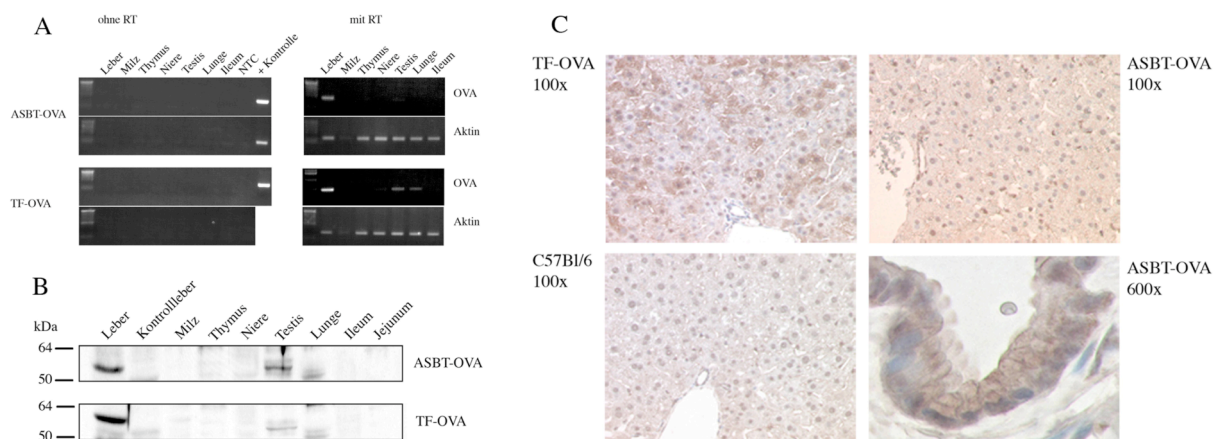
Eine wesentliche Grundlage für alle Versuche war die Absicherung der Expression des transgenen Fusionsproteins in den erzeugten Stämmen ASBT-OVA und TF-OVA. Wie in 1.5 beschrieben, sollte die Expression des transgenen Fusionsproteins, bestehend aus Transferrinrezeptor-Transmembrandomäne und OVA<sub>139-385</sub>, unter der Kontrolle des ASBT- bzw. TF-Promotors in Cholangiozyten bzw. Hepatozyten erzielt werden. Ob die organ- und zellspezifische Expression des Transgens auch erfolgt, wurde zu Beginn der Arbeit durch Nachweis von Ovalbumin mittels RT-PCR und Western Blot in verschiedenen Organen sowie mittels immunhistochemischer Analyse in der Leber getestet.

Die Expression des Transgens in ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen wurde mittels Detektion der mRNA durch reverse Transkription und anschließende PCR in Leber, Milz, Thymus, Niere, Testis, Lunge und Ileum beider Mausstämmen überprüft (Abb. 4A, mit RT). In beiden Stämmen konnte die Expression in der Leber bestätigt werden. Es wurde außerdem eine geringe mRNA Expression des Transgens in Lunge und Testis in TF-OVA sowie im Ileum in ASBT-OVA Mäusen nachgewiesen. Die Kontrollansätze ohne reverse Transkription wiesen keine Banden auf (Abb. 4A, ohne RT).

Die Expression des Transgens in den Mäusen wurde des Weiteren durch Detektion des Fusionsproteins und Nachweis von Ovalbumin mittels Western Blot in Leber, Milz, Thymus, Niere, Testis, Lunge, Ileum und Jejunum der beiden transgenen Stämme ASBT-OVA und TF-OVA überprüft. Als Negativkontrolle dienten Proteinlysate der Leber von C57Bl/6 Mäusen (Kontrollleber) (Abb. 4B). In beiden transgenen Stämmen, aber nicht in C57Bl/6 Mäusen wurde eine Expression von Ovalbumin und somit des Transgens ausschließlich in der Leber nachgewiesen.

Mittels Immunhistochemie wurde die Expression von Ovalbumin in den Hepatozyten des Lebergewebes von TF-OVA Mäusen, aber nicht von C57Bl/6 oder ASBT-OVA Mäusen bestätigt. Abbildung 1C zeigt deutlich eine Expression in den Epithelzellen der größeren Gallengänge von ASBT-OVA Mäusen (Abb. 4C).

Damit wurde durch die drei Nachweismethoden sowohl die organspezifische als auch die zellspezifische Expression von Ovalbumin bestätigt.



**Abb. 4: Leberspezifische Expression von Ovalbumin in ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen.**

Nachweis von Ovalbumin in ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen in einzelnen Organen mittels mRNA Expression mit und ohne RT (A) und auf Proteinebene (B) sowie mittels Immunhistochemie in der Leber (C).

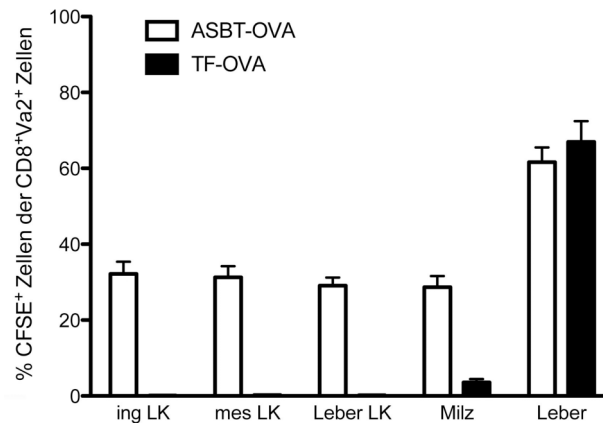
## 4.2 Präsentation von hepatischen Antigenen und Aktivierung von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen

### 4.2.1 Antigenabhängige Migration von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen

Zur Immunüberwachung rezirkulieren naive Lymphozyten kontinuierlich durch die peripheren lymphoiden Organe. Die transendotheliale Migration in die Lymphknoten und Organe erfolgt durch das Zusammenspiel gewebespezifischer Adhäsionsmoleküle und Chemokine in einem sogenannten Multi-Step-Adhäsions-Modell (Springer, 1995). Die Leber unterscheidet sich von anderen Organen durch das Fehlen der Basalmembran und den langsamen Blutfluss in den Sinusoiden, wodurch die selektinunabhängige Interaktion zwischen zirkulierenden Lymphozyten und organspezifischen Zellen ermöglicht wird (Ando, et al., 1994; Wong, et al., 1997). Antigen-spezifische naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen akkumulieren nach dem intravenösen Transfer selektiv in der Leber transgener Mäuse, die den passenden MHC-I/Antigen-Komplex auf Hepatozyten exprimieren, aber nicht in der Leber von Wildtypmäusen ohne Antigenexpression (Bertolino, et al., 2001).

Um den Einfluss der Expression von Ovalbumin in Cholangiozyten oder Hepatozyten auf das Migrationsverhalten antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu untersuchen, wurden OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus den Lymphknoten und der Milz von OT-I Mäusen aufgereinigt, mit CFSE markiert und *i.v.* in ASBT-OVA oder TF-OVA Mäuse injiziert. 20h nach dem Transfer wurde in verschiedenen lymphatischen Organen und in der Leber untersucht, wieviel Prozent CFSE<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD8<sup>+</sup>Vα2<sup>+</sup> Zellpopulation vorhanden sind. Zu diesem Zeitpunkt findet noch keine Proliferation statt (siehe Abb. 6), so dass der Anteil migrierter Zellen nicht durch bereits proliferierte Zellen erhöht ist. In beiden Stämmen wurde eine Präferenz der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen für die Leber beobachtet (62% ASBT-OVA, 66% TF-OVA) (Abb. 5). In ASBT-OVA Mäusen kam es zusätzlich in verschiedenen lymphatischen Organen zu einer Anreicherung von CFSE<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Vα2<sup>+</sup> Zellen (z.B. 29% in der Milz). Dagegen fanden sich in den Lymphknoten und der Milz der TF-OVA Mäuse nur sehr

wenige CFSE<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Vα2<sup>+</sup> Zellen. Es fand also ein effizientes „trapping“ der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber durch die Ovalbumin exprimierenden Hepatozyten statt, da in TF-OVA Mäusen die transferten Zellen fast ausschließlich in die Leber migrierten.



**Abb. 5: Migration von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen.**

20h nach dem Transfer von OT-I CD8<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> T-Zellen in ASBT-OVA und TF-OVA Mäuse wurden die Zellen aus den inguinalen (ing LK), mesenterialen (mes LK) und Leberlymphknoten (Leber LK) sowie Leber und Milz isoliert und mittels Durchflusszytometrie auf die Anwesenheit von CFSE<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Vα2<sup>+</sup> Zellen überprüft. Dargestellt sind die Mittelwerte (±SEM) des Anteils der CFSE<sup>+</sup> Zellen von n = 4/Gruppe.

#### 4.2.2 Proliferation von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen

Um zu überprüfen, ob nach der antigenspezifischen Migration in die Leber auch eine Aktivierung erfolgt, wurde das Proliferationsverhalten CFSE-markierter OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen 20h und 44h nach dem Transfer in verschiedenen Organen von ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen untersucht (Abb. 6A). Es stellte sich heraus, dass 20h nach dem Zelltransfer weder in ASBT-OVA noch in TF-OVA Mäusen Proliferation stattfindet. In ASBT-OVA Mäusen wurde 44h nach Transfer in der Leber Proliferation festgestellt. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten aktiviert, da mehrere Proliferationspeaks zu unterscheiden waren. Zusätzlich wurden proliferierende Zellen mit einer langsameren Kinetik in den die Leber drainierenden (Leber LK) und den mesenterialen Lymphknoten (mes LK) sowie zu einem geringen Maß in den inguinalen Lymphknoten (ing LK), aber nicht in der Milz beobachtet.

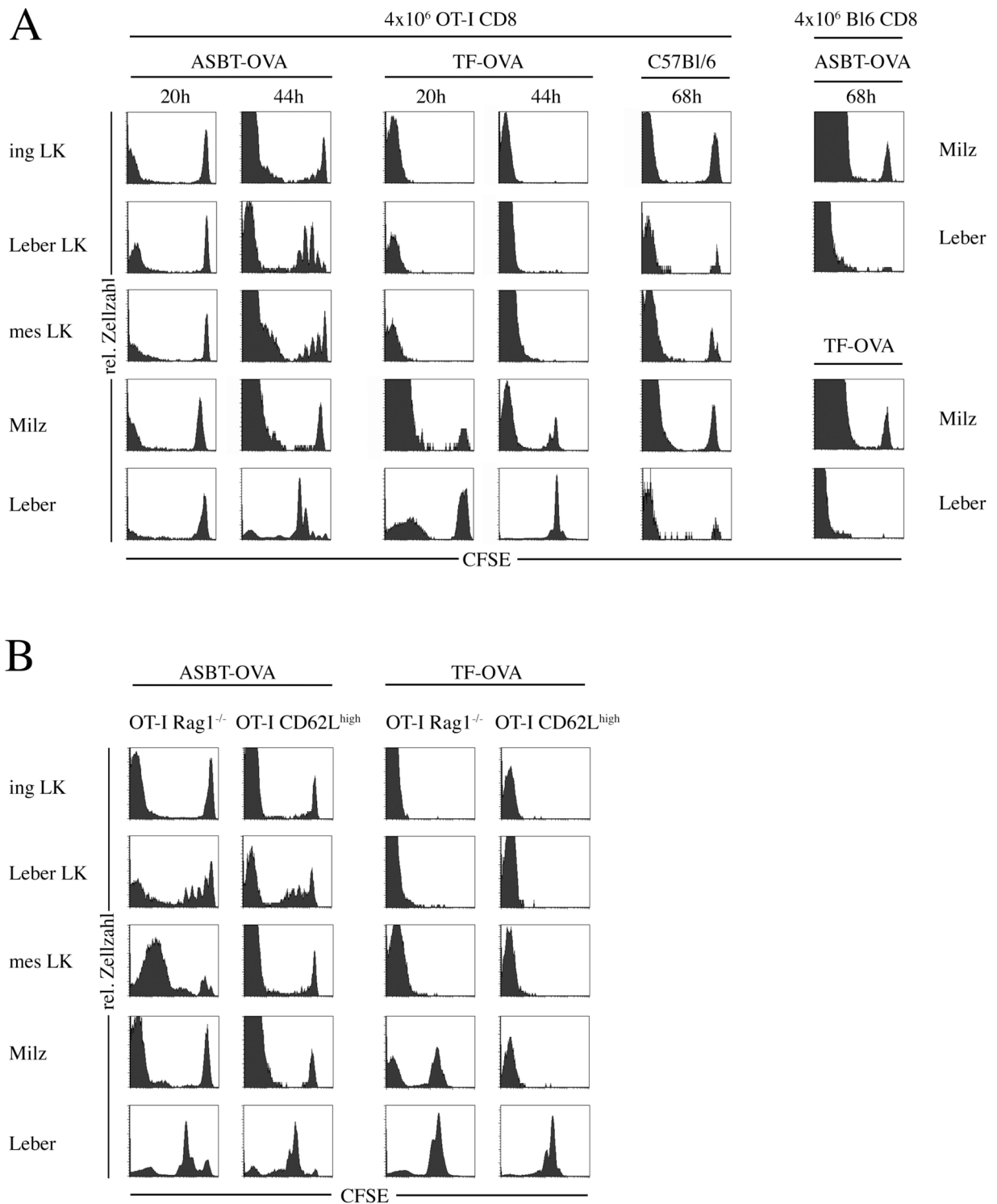
In TF-OVA Mäusen wurde 44h nach Transfer fast ausschließlich in der Leber Proliferation festgestellt. Das Vorhandensein eines singulären Peaks zeigt, dass alle Zellen gleichzeitig aktiviert wurden. Während in einigen Experimenten zu diesem Zeitpunkt auch in der Milz von TF-OVA Mäusen proliferierende Zellen beobachtet wurden, konnte 44h nach Transfer keine Proliferation in den getesteten Lymphknoten festgestellt werden. Im Vergleich von TF-OVA zu ASBT-OVA Mäusen wird deutlich, dass sich die Aktivierung der OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von ASBT-OVA Mäusen mit einer langsameren Kinetik vollzieht als in TF-OVA Mäusen.

Zur Überprüfung der Antigen-spezifität der beobachteten Effekte wurden antigenspezifische OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in C57Bl/6 Mäuse sowie unspezifische C57Bl/6 CD8<sup>+</sup> T-Zellen in ASBT-OVA und

TF-OVA Mäuse transferiert. Um eine Proliferation sicher auszuschließen, erfolgte die Untersuchung der Organe in diesen Kontrollen zu einem späteren Zeitpunkt (68h). Sowohl der Transfer von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in C57Bl/6 Mäuse als auch der Transfer von C57Bl/6 CD8<sup>+</sup> T-Zellen in ASBT-OVA und TF-OVA Mäuse führte nicht zur Aktivierung und Proliferation.

Da die zuvor verwendeten OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Mäusen isoliert wurden, die einen Rag (recombination activating gene) kompetenten Hintergrund haben, wurde die Proliferation 44h nach Transfer von Rag1<sup>-/-</sup> OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen bzw. CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>high</sup> selektionierten Zellen untersucht (Abb. 6B). Diese Zellen wiesen jeweils ein vergleichbares Proliferationsverhalten auf, wie in Abb. 6A dargestellt.

Die Untersuchungen zeigen also, dass die Expression von Ovalbumin in Hepatozyten zur Proliferation antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber führt, während die Expression in Cholangiozyten in einer verzögerten Aktivierung in der Leber und in der Aktivierung in den drainierenden Lymphknoten resultiert.



**Abb. 6: Proliferation von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen.**

20h, 44h oder 68h nach dem Transfer von CFSE-markierten OT-I CD8<sup>+</sup> (A), Rag1<sup>-/-</sup> OT-I bzw. CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>high</sup> T-Zellen (B) in ASBT-OVA, TF-OVA oder C57Bl/6 Mäuse wurden die Zellen aus den inguinalen (ing LK), mesenterialen (mes LK) und leberdrainierenden Lymphknoten (Leber LK) sowie Leber und Milz isoliert und mittels Durchflusszytometrie auf die Anwesenheit von CFSE<sup>+</sup> Zellen überprüft. Dargestellt sind repräsentative Histogramme mit dem Gate auf CD8<sup>+</sup>Vα2<sup>+</sup> Zellen von n = 6/Gruppe (A), n = 4/Gruppe (B). Als Kontrolle wurden CD8<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> T-Zellen aus C57Bl/6 in ASBT-OVA und TF-OVA Mäuse transferiert. 68h nach dem Transfer wurden die Zellen aus Leber und Milz isoliert und ebenfalls auf die Anwesenheit von CFSE<sup>+</sup> Zellen überprüft. Dargestellt sind repräsentative Histogramme mit dem Gate auf CD8<sup>+</sup> Zellen von n = 6/Gruppe (A).

### 4.2.3 Induktion von Entzündung durch den Transfer von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Wie im vorherigen Abschnitt gezeigt, wandern die transferierten OT-I CD8<sup>+</sup> Zellen antigenspezifisch in die Leber ein und proliferieren dort. Deshalb wurde als nächstes untersucht, ob sie auch in der Leber akkumulieren und durch Differenzierung zu Effektorzellen eine Leberentzündung auslösen. Dazu wurde im Verlauf von zwei Wochen nach dem Transfer der OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen die Zahl der antigenspezifischen Zellen in verschiedenen Organen bestimmt, die Leber wurde histologisch untersucht und die Effektorfunktion durch die Messung des Enzyms Alaninaminotransferase (ALT) im Plasma sowie durch Zytokinmessung und einen *in vivo* Zytolyse Assay bewertet.

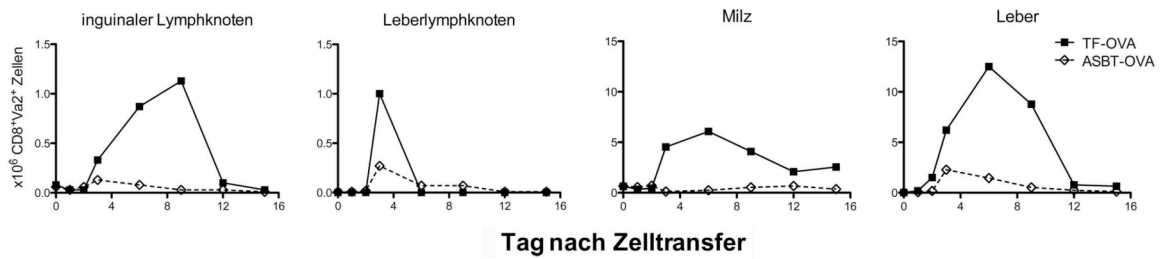
#### 4.2.3.1 Akkumulation von CD8<sup>+</sup>V $\alpha$ 2<sup>+</sup> Zellen in der Leber von ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen

In Abb. 7A ist dargestellt, wie sich die Anzahl der CD8<sup>+</sup>V $\alpha$ 2<sup>+</sup> Zellen im Verlauf von 15 Tagen nach dem Transfer von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen verändert. In beiden Stämmen wurde ein Anstieg der Anzahl von CD8<sup>+</sup>V $\alpha$ 2<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber bereits zwei Tage nach dem Transfer beobachtet. Aus den Lebern von TF-OVA Mäusen wurde ein Vielfaches der Zellen isoliert, die aus den Lebern von ASBT-OVA Mäusen isoliert wurden. Die höchste Anzahl von CD8<sup>+</sup>V $\alpha$ 2<sup>+</sup> Zellen in der Leber wurde bei TF-OVA Mäusen am Tag 6, bei ASBT-OVA Mäusen dagegen schon am Tag 3 ermittelt. Während in ASBT-OVA Mäusen in allen untersuchten Organen am Tag 3 nach dem Zelltransfer die höchste Anzahl von CD8<sup>+</sup>V $\alpha$ 2<sup>+</sup> Zellen vorhanden war, beobachtete man in TF-OVA nur im Leberlymphknoten ebenfalls einen Anstieg der Zellzahl zu diesem Zeitpunkt. In den inguinalen Lymphknoten und der Milz jedoch erfolgte der Anstieg der Anzahl von CD8<sup>+</sup>V $\alpha$ 2<sup>+</sup> Zellen erst zum Tag 6 und 9. Die Zellzahlen sanken spätestens zum Tag 12 wieder auf das Ausgangsniveau ab.

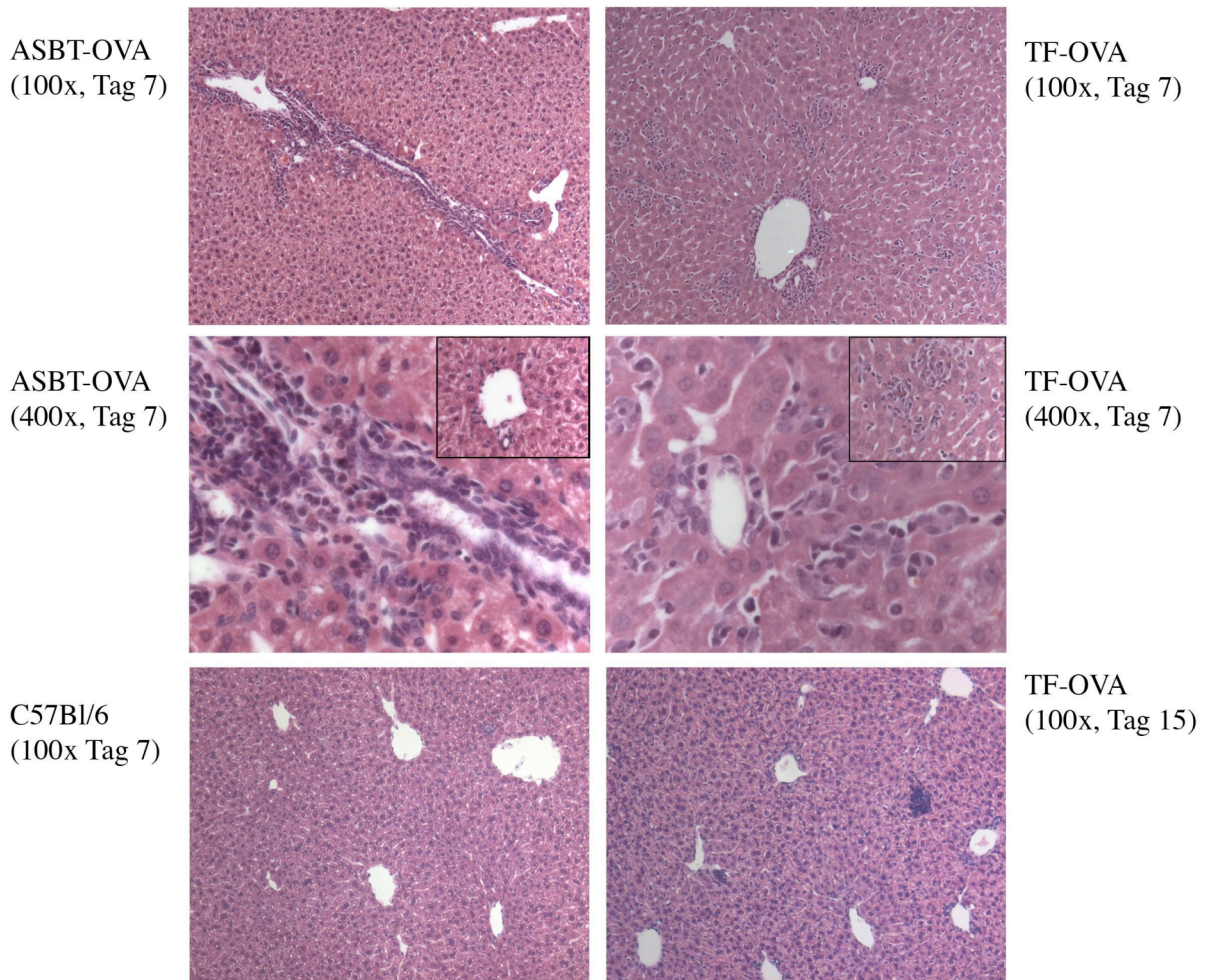
Die Expression von Ovalbumin in Hepatozyten oder Cholangiozyten führte zu einer transienten differenziellen Expansion antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Leber, Milz und Lymphknoten.

Um zu untersuchen, ob die transferierten OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch eine Infiltration der Leber verursachen, wurden sieben bzw. 15 Tage nach dem Zelltransfer die Lebern entnommen und histologisch mit einer H&E-Färbung untersucht (Abb. 7B). Die Analyse der Lebern nach einer Woche ergab, dass der Transfer zu einem portalen und lobulären Infiltrat in TF-OVA Mäusen führte. Im Gegensatz dazu waren die Infiltrate in ASBT-OVA Mäusen auf die Portalfelder beschränkt. In C57Bl/6 Wildtypmäusen waren keine Infiltrate zu beobachten. In Übereinstimmung mit der vorhergehenden Untersuchung der Zellzahl waren nach zwei Wochen keine Infiltrate mehr in der Leber von TF-OVA Mäusen sichtbar.

A



B



**Abb. 7: Akkumulation von  $CD8^+V\alpha2^+$  Zellen und differentielles Infiltrat in der Leber von ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen.**

An den angegebenen Tagen nach dem Transfer von OT-I  $CD8^+$  T-Zellen in ASBT-OVA und TF-OVA Mäuse wurden die Zellen aus den inguinalen und Leberlymphknoten sowie Leber und Milz isoliert, die Zellzahl bestimmt und mittels Durchflusszytometrie auf die Anwesenheit transgener  $CD8^+V\alpha2^+$  T-Zellen überprüft. Dargestellt ist der Mittelwert der absoluten Zellzahl von  $CD8^+V\alpha2^+$  T-Zellen von n=2-8/Gruppe (A). Sieben oder 15 Tage nach dem Transfer von  $8 \times 10^6$  OT-I  $CD8^+$  T-Zellen in ASBT-OVA, TF-OVA und C57Bl/6 wurden die Mäuse getötet, die Lebern entfernt und für die histologische Analyse aufgearbeitet. Dargestellt sind repräsentative Bilder der Lebern mit H&E-Färbungen von n=6/Gruppe (B).



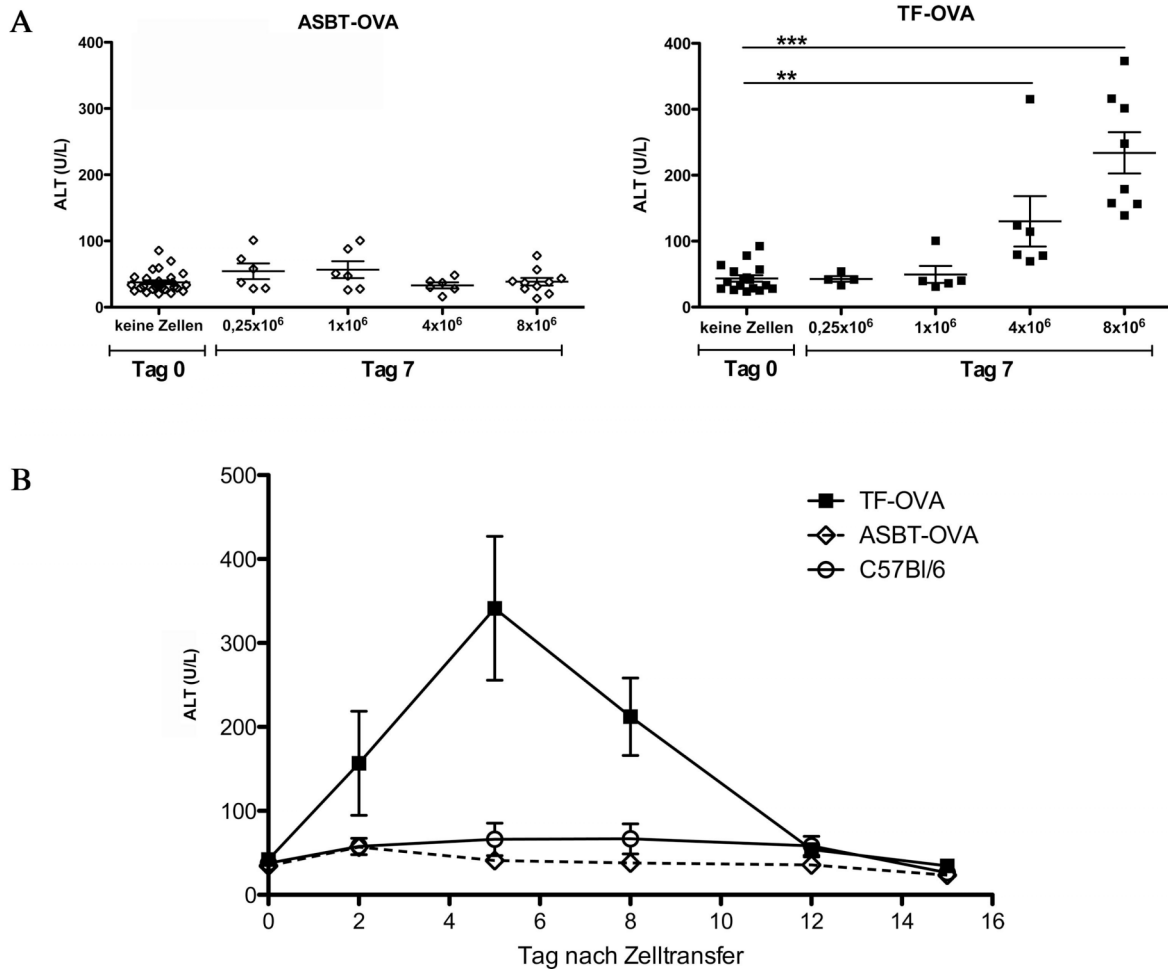
#### 4.2.3.2 Induktion einer transienten Hepatitis durch OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in TF-OVA Mäusen

Bisher konnte gezeigt werden, dass die antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in beiden transgenen Mausstämmen in der Leber proliferieren und die Leber infiltrieren. Allerdings war noch nicht bekannt, ob sie trotz des toleranten Lebermilieus eine Hepatitis auslösen.

Die Messung des Enzyms Alaninaminotransferase im Plasma sollte darüber Aufschluss geben, ob nach dem Transfer verschiedener Zellkonzentrationen von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine Hepatitis induziert wird. Dazu wurde den Versuchstieren vor und sieben Tage nach dem Zelltransfer Blut entnommen, und die ALT-Werte wurden bestimmt (Abb. 8A). In ASBT-OVA Mäusen führte auch der Transfer einer hohen Zellzahl ( $8 \times 10^6$ ) von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen nicht zu einem Anstieg der ALT-Werte am Tag 7, wohingegen in TF-OVA Mäusen die ALT-Werte eine Woche nach dem Transfer von  $4 \times 10^6$  bzw.  $8 \times 10^6$  OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen signifikant auf  $130,2 \pm 38,1$  U/L bzw.  $233,9 \pm 31,3$  U/L anstiegen.

Um den zeitlichen Verlauf der induzierten Hepatitis genauer zu analysieren, wurde in ASBT-OVA, TF-OVA und C57Bl/6 Mäusen vor sowie zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Transfer von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen Blut entnommen und der ALT-Wert im Plasma bestimmt (Abb. 8B). Im Stamm ASBT-OVA war ein geringer Anstieg der ALT-Werte an Tag 2 ( $57,0 \pm 8,6$  U/L) im Vergleich zum Ausgangswert ( $34,4 \pm 3,4$  U/L) zu verzeichnen. Dieser Anstieg ist jedoch unspezifisch, denn auch in C57Bl/6 Kontroll-Mäusen war ein leichter Anstieg der ALT-Werte an Tag 2 ( $57,6 \pm 9,7$  U/L) im Vergleich zum Ausgangswert ( $37,7 \pm 4,3$  U/L) zu beobachten. In TF-OVA Mäusen erreichten die ALT-Werte ihr Maximum an Tag 5 ( $341,4 \pm 85,7$  U/L) nach Zelltransfer. Aus den hier ermittelten Daten kann man von einer transienten Hepatitis ausgehen, da die ALT-Werte zwei Wochen nach dem Zelltransfer wieder die Ausgangswerte erreichten.

Die Aktivierung von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch ein von Hepatozyten, aber nicht durch ein von Cholangiozyten exprimiertes Antigen führt zur Entstehung einer transienten Hepatitis.



**Abb. 8: OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen induzieren eine transiente Leberentzündung.**

Vor sowie sieben Tage nach Transfer von  $0,25 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$  oder  $8 \times 10^6$  OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in ASBT-OVA und TF-OVA Mäuse wurde Blut entnommen und der ALT-Wert im Plasma bestimmt. Dargestellt sind die absoluten ALT-Werte ( $n=4-8$ )  $\pm$ SEM (\*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ , Mann-Whitney-Test) (A). Vor sowie 2, 5, 8, 12 und 15 Tage nach Transfer von  $8 \times 10^6$  OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in ASBT-OVA, TF-OVA und C57Bl/6 Mäuse wurde Blut entnommen und der ALT-Wert im Plasma bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM der absoluten ALT-Werte von  $n=8$ /Gruppe (B).

#### 4.2.3.3 In der Leber aktivierte OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen erlangen Effektorfunktion

Um zu überprüfen, ob die Leberschädigung und der daraus resultierende Anstieg der ALT-Werte durch die in der Leber aktivierten OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen ausgelöst wird und ob die antigenspezifischen T-Zellen auch Effektorfunktion erlangen, wurde die Zytokinproduktion der aus der Leber isolierten Zellen untersucht.

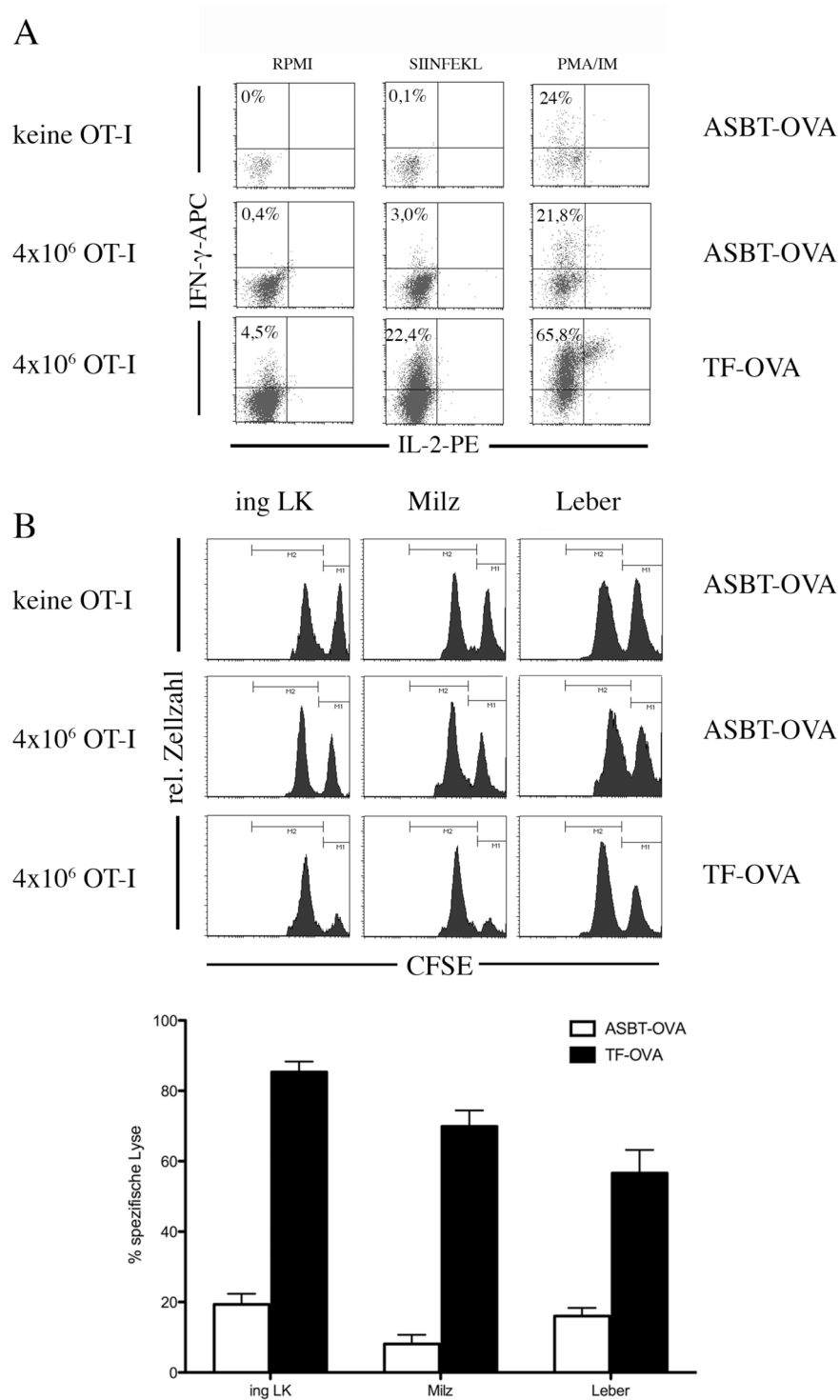
Dazu wurden sechs Tage nach dem Transfer von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in ASBT-OVA und TF-OVA Mäuse die intrahepatischen Lymphozyten isoliert und restimuliert. Anschließend wurde durch die intrazelluläre Färbung von IFN- $\gamma$  und IL-2 die Zytokinproduktion der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup>V $\alpha$ 2<sup>+</sup> Zellen untersucht (Abb. 9A).

In TF-OVA Mäusen produzierten im Mittel 6,5% der aus der Leber isolierten CD8<sup>+</sup>V $\alpha$ 2<sup>+</sup> Zellen IFN- $\gamma$ . Im Gegensatz dazu konnte bei den aus ASBT-OVA gewonnenen Zellen nur ein geringer Teil IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>

Zellen nachgewiesen werden (MW 0,9%) (Abb. 9A). Nach der Restimulation für 6h mit SIINFEKL stieg der Anteil der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen bei den aus TF-OVA Mäusen isolierten Zellen auf 30,8% und bei den aus ASBT-OVA Mäusen gewonnenen Zellen auf 5,4% an. Bei der maximalen Stimulation mit PMA/IM betrug der Anteil IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen bei den aus TF-OVA bzw. ASBT-OVA Mäusen isolierten Zellen 79,2% und 15,4%. Als Kontrolle wurden intrahepatische Lymphozyten aus ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen isoliert, die keine OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen erhalten hatten. In Abb. 9A sind als Beispiel aus ASBT-OVA Mäusen isolierte Zellen gezeigt. Ähnliche Ergebnisse wurden mit IHL, isoliert aus unbehandelten TF-OVA Mäusen, erzielt. Bei diesen Zellen erzielt man mit der Stimulation von PMA/IM 32,9% IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen. Dagegen wurde bei Stimulation mit dem antigenspezifischen Peptid SIINFEKL weniger als 1% IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen aktiviert.

Um die Effektorfunktion der OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen weiter zu charakterisieren, wurde die zytolytische Aktivität der *in vivo* in der Leber aktivierten Zellen mit einem *in vivo* Zytolyse Assay untersucht. In TF-OVA Mäusen konnten in allen getesteten Organen sehr hohe antigenspezifische zytolytische Effekte nachgewiesen werden, während in ASBT-OVA Mäusen die Fähigkeit zu Lyse wesentlich geringer war (Abb. 9B). In TF-OVA Mäusen betrug die spezifische Zytolyse im inguinalen Lymphknoten  $85,3 \pm 3\%$ , in der Milz  $69,9 \pm 4,5\%$  und in der Leber  $56,6 \pm 6,6\%$ . In ASBT-OVA Mäusen erreichte die Lyse im Vergleich dazu im inguinalen Lymphknoten nur  $19,3 \pm 3\%$ , in der Milz  $8,1 \pm 2,6\%$  bzw. in der Leber nur  $16 \pm 2,3\%$ .

Werden OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch ein von Cholangiozyten oder Hepatozyten exprimiertes Antigen aktiviert, differenzieren sie also zu CD8<sup>+</sup> Effektor T-Zellen mit einem unterschiedlichen Ausmaß der Effektorfunktion.



**Abb. 9: Effektorfunktion der in ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen aktivierten OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen.**

Sechs Tage nach Transfer von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in ASBT-OVA und TF-OVA Mäuse wurden aus der Leber IHL aufgereinigt und entweder *in vitro* unstimuliert inkubiert oder mit SIINFEKL bzw. PMA/IM restimuliert. Als Kontrolle wurden aus unbehandelten ASBT-OVA Mäusen die IHL isoliert und ebenso behandelt. Dargestellt sind repräsentative Plots mit dem Gate auf CD8<sup>+</sup>V $\alpha$ 2<sup>+</sup> Zellen von n=6/Gruppe (A). Keine oder 4x10<sup>6</sup> OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden *i. v.* in ASBT-OVA und TF-OVA Mäuse transferiert. Sechs Tage später wurde der *in vivo* Zytolyse Assay durchgeführt. Die Zellen wurden aus den inguinalen Lymphknoten (ing LK), der Milz und Leber isoliert, CFSE<sup>+</sup> Zellen analysiert und die spezifische Lyse berechnet. Dargestellt sind repräsentative Histogramme und die Mittelwerte der spezifischen Lyse  $\pm$ SEM von n=6/Gruppe (B).

#### 4.2.4 Die Aktivierung von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen erfolgt in der Leber unabhängig von Milz und Lymphknoten

Da in einigen Versuchen nach dem Zelltransfer von OT-I CFSE<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in TF-OVA Mäusen proliferierende Zellen in der Milz und in ASBT-OVA Mäusen in den drainierenden Lymphknoten zu finden waren (Abb. 6), war es unklar, ob die OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch unabhängig von professionellen APZ der Milz und der Lymphknoten in der Leber aktiviert werden können. Um auszuschließen, dass die Milz für die Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen notwendig ist, wurden OT-I CFSE<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in splenektomierte ASBT-OVA (ASBT-OVA<sup>splen</sup>) und TF-OVA (TF-OVA<sup>splen</sup>) Mäuse transferiert. Außerdem wurde die L-Selektin abhängige Migration der OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen über die „high endothelial venules“ (HEV) der Lymphknoten durch die Injektion von CD62L Antikörper verhindert. Es wurde nachgewiesen, dass die OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von ASBT-OVA<sup>splen</sup> und TF-OVA<sup>splen</sup> Mäusen auch ohne Beteiligung der Milz und der Lymphknoten aktiviert werden und wie zuvor beschrieben in der Leber proliferieren (Abb. 10A).

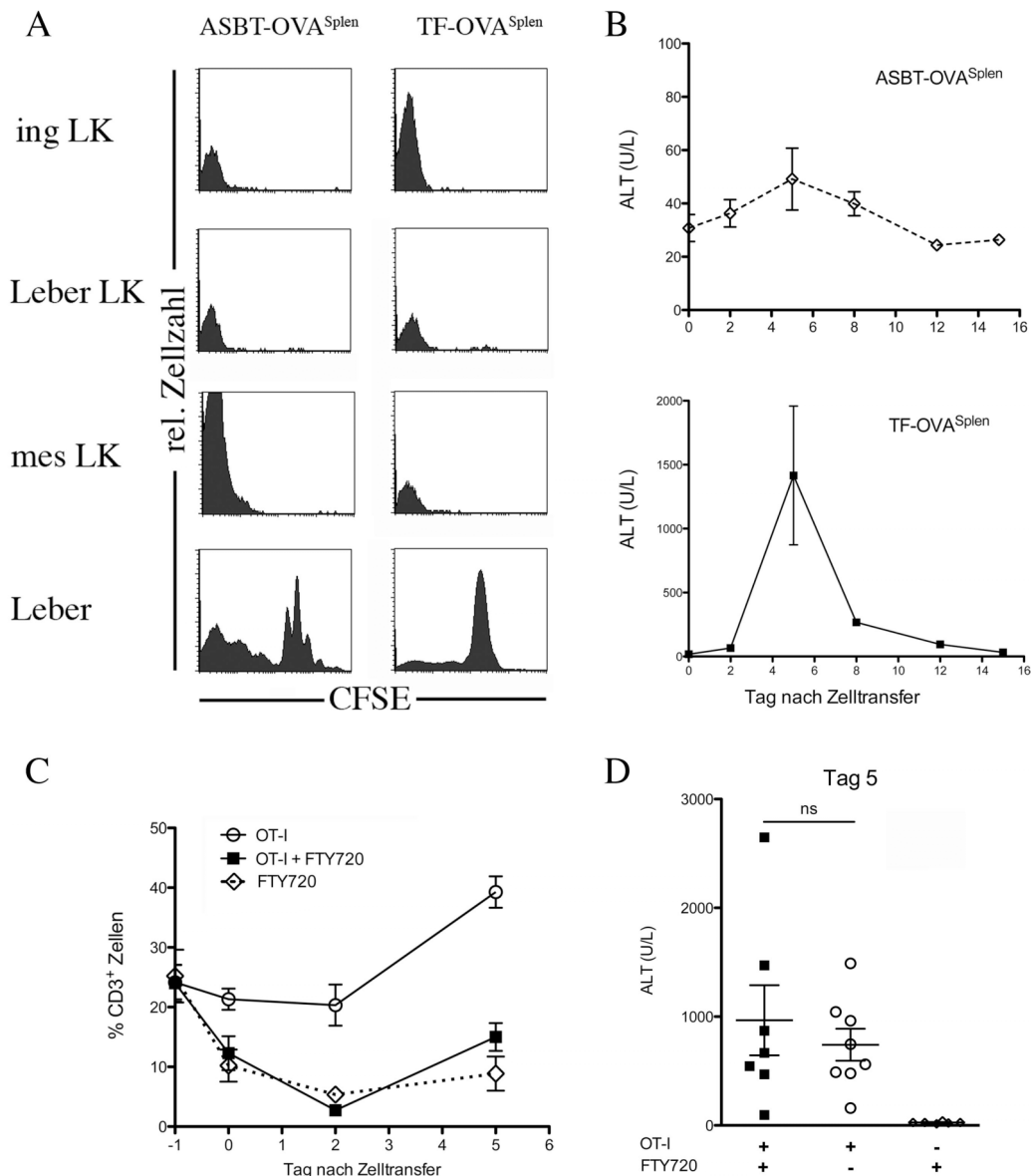
Da Proliferation nicht unbedingt auch ein Erlangen von Effektorfunktionen bedeutet, wurde überprüft, ob auch in ASBT-OVA<sup>splen</sup> und TF-OVA<sup>splen</sup> Mäusen durch den Transfer antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine Hepatitis induziert werden kann. Das Ausmaß der induzierten Hepatitis, gemessen am ALT-Wert, war in den TF-OVA<sup>splen</sup> Mäusen größer als in nicht-splenektomierten Mäusen (Abb. 10B, siehe zum Vergleich dazu Abb. 8B). Der Höhepunkt der ALT-Werte fand sich am Tag 5, und die Werte stiegen im Mittel auf  $1416 \pm 542,8$  U/L an. In ASBT-OVA<sup>splen</sup> Mäusen wurde eine geringe Erhöhung der ALT-Werte auf  $49,2 \pm 11,6$  U/L an Tag 5 beobachtet. Dies stellte keine signifikante Erhöhung der ALT-Werte im Vergleich zum Ausgangswert am Tag 0 ( $30,8 \pm 5,1$  U/L) sowie zu den nicht-splenektomierten Tieren am Tag 5 dar (siehe Abb. 8B).

Um auszuschließen, dass die CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den Lymphknoten aktiviert und danach umverteilt werden, wurde der Versuch mit TF-OVA<sup>splen</sup> Mäusen wiederholt, die zusätzlich mit der Substanz FTY720 behandelt wurden. FTY720 (Fingolimod) ist ein chemisches Derivat von Myriocin und strukturell analog zu Sphingosin (Fujita, et al., 1994). Es wird durch Sphingosin-Kinasen phosphoryliert (Billich, et al., 2003) und bewirkt als funktioneller Antagonist der Sphingosin-1-Phosphatrezeptoren (S1P<sub>1,3,4,5</sub>) eine Hemmung des Austritts von Lymphozyten aus Lymphknoten und Thymus (Mandala, et al., 2002; Mullershausen, et al., 2009; Pinschewer, et al., 2000). TF-OVA<sup>splen</sup> Mäuse wurden entweder nur mit FTY720 behandelt oder es wurde zusätzlich zum Transfer von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen FTY720 bzw. Trägersubstanz injiziert. Der Anteil der CD3<sup>+</sup> Zellen im Blut wurde dabei einen Tag vor Behandlungsbeginn, zum Zeitpunkt des Zelltransfers (Tag 0) sowie zwei und fünf Tage danach überprüft. Das diente dem Nachweis, dass die T-Zellen in ihrem Migrationsverhalten behindert werden und dass aufgrund der Austrittsblockade weniger Zellen im Blut zirkulieren (Abb. 10C). Bereits 6h nach der Behandlung mit FTY720 wurde ein deutlicher Abfall der CD3<sup>+</sup> Zellen im Blut beobachtet, der an Tag 2 nach wiederholter Injektion nochmals verstärkt wurde. Zum Tag 5 stieg der Anteil in der mit Zellen und FTY720 behandelten Gruppe wieder geringfügig an. Dabei handelt es

sich vermutlich um aus der Leber umverteilte Zellen, denn auch im Blut der Tiere, die nur Zellen, aber kein FTY720 erhalten hatten, erhöhte sich der Anteil der CD3<sup>+</sup> Zellen.

Fünf Tage nach Zelltransfer wurde des Weiteren Blut entnommen und der ALT-Wert bestimmt. Die ALT-Werte stiegen nach Transfer von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf  $741,1 \pm 146,6$  U/L und nach dem Transfer der Zellen und gleichzeitiger FTY720-Behandlung im Mittel auf  $966,3 \pm 322,4$  U/L an. Dieser Unterschied war nicht signifikant. Die Behandlung mit FTY720 allein resultierte nicht in einem Anstieg der ALT-Werte ( $26,6 \pm 3,6$  U/L) (Abb. 10D).

Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass die APZ der Milz und der Lymphknoten nicht für die Aktivierung der OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch ein von Hepatozyten exprimiertes Antigen notwendig sind. Antigen-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnten unabhängig von Milz und Lymphknoten vollständig aktiviert werden und induzierten eine Leberschädigung. Die Aktivierung zu Effektorzellen durch ein von Cholangiozyten exprimiertes Antigen ist aufgrund der niedrigen ALT-Werte nicht sicher zu beurteilen.



**Abb. 10: Die Aktivierung von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen erfolgt unabhängig von Milz und Lymphknoten.**

44h nach dem Transfer von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in mit CD62L Antikörper behandelte splenektomierte ASBT-OVA bzw. TF-OVA Mäuse (ASBT-OVA<sup>splen</sup>, TF-OVA<sup>splen</sup>) wurden die Zellen aus den inguinalen (ing LK), mesenterialen (mes LK) und Leberlymphknoten (Leber LK) sowie der Leber isoliert und mittels Durchflusszytometrie auf die Anwesenheit von CFSE<sup>+</sup> Zellen überprüft. Dargestellt sind repräsentative Histogramme mit dem Gate auf CD8<sup>+</sup>Vα2<sup>+</sup> Zellen von n=4/Gruppe (A). Zur Bestimmung der absoluten ALT-Werte (MW ± SEM, n=4/Gruppe) wurden 8x10<sup>6</sup> OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen transferiert und Blut zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen (B). In (C) und (D) wurden TF-OVA<sup>splen</sup> Mäuse zusätzlich zum Transfer von 8x10<sup>6</sup> OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit FTY720 behandelt. Dargestellt sind der Anteil der CD3<sup>+</sup> Zellen (in %) im peripheren Blut sowie die absoluten ALT-Werte am Tag 5 (MW ± SEM) von n=6-8/Gruppe (ns = nicht signifikant, ungepaarter student's t-test).

#### 4.2.5 Knochenmarkabhängige antigenpräsentierende Zellen sind notwendig zur vollständigen Aktivierung von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber

In den vorangehenden Versuchen wurde gezeigt, dass OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen unabhängig von professionellen APZ der Milz oder der Lymphknoten aktiviert werden und zur Schädigung der Leber führen. In der Leber von ASBT-OVA bzw. TF-OVA Mäusen gibt es verschiedene Zellpopulationen, die für die Aktivierung der OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen

verantwortlich sein können. Sowohl knochenmarkabhängige professionelle APZ, wie Dendritische Zellen und Kupffer Zellen, als auch nicht-hämatopoetische Zellen wie Hepatozyten, Cholangiozyten, Leberendothelzellen oder Ito-Zellen können Antigen präsentieren und mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen, CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder NKT-Zellen interagieren.

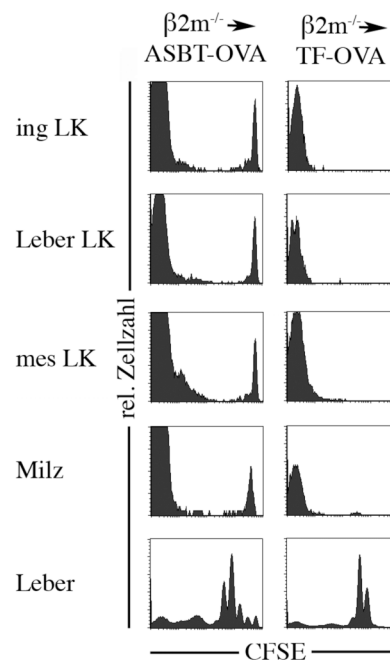
Im Folgenden galt es zu untersuchen, ob professionelle APZ notwendig sind, um in ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu aktivieren. Dazu wurden Knochenmarkchimären generiert, indem ASBT-OVA und TF-OVA Mäuse letal bestrahlt und mit Knochenmark aus  $\beta 2m^{-/-}$  Mäusen rekonstituiert wurden. Aufgrund der Deletion des  $\beta 2$ -Mikroglobulin-Gens können die knochenmarkabhängigen APZ der entstandenen Chimären nahezu kein MHC-I auf der Zelloberfläche exprimieren und sind nicht mehr in der Lage, OVA<sub>257-264</sub> auf MHC-I zu präsentieren. Bei Hepatozyten, Cholangiozyten, Ito-Zellen oder LSEC hingegen bleibt diese Eigenschaft erhalten.

#### **4.2.5.1 Proliferation von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in $\beta 2m^{-/-}$ →ASBT-OVA und $\beta 2m^{-/-}$ →TF-OVA Chimären**

Die Versuche zur Überprüfung der Aktivierung zeigten, dass nach dem Transfer von OT-I CFSE<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in  $\beta 2m^{-/-}$ →ASBT-OVA bzw.  $\beta 2m^{-/-}$ →TF-OVA Chimären die Proliferation in beiden Stämmen weiterhin in der Leber erfolgt. Jedoch konnte in  $\beta 2m^{-/-}$ →ASBT-OVA Chimären keine Proliferation in den Lymphknoten mehr nachgewiesen werden (Abb. 11). In ASBT-OVA Mäusen erfolgt demnach die Präsentation von Ovalbumin in den Lymphknoten durch knochenmarkabhängige APZ. Dagegen kann die Präsentation von Ovalbumin und Aktivierung der OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen durch die nicht-knochenmarkabhängigen Cholangiozyten bzw. Hepatozyten oder durch kreuzpräsentierende LSEC und Ito-Zellen erfolgen.

Die Präsentation von hepatischem Antigen in Lymphknoten, Milz oder Leber durch knochenmarkabhängige APZ ist nicht erforderlich, um in OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch das von Cholangiozyten oder Hepatozyten exprimierte Antigen Proliferation zu bewirken.





**Abb. 11: Proliferation von OT-I CD8 T Zellen in  $\beta 2m^{-/-}$  ASBT-OVA und  $\beta 2m^{-/-}$  TF-OVA Chimären.**

44h nach dem Transfer von OT-I CD8<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> T-Zellen in  $\beta 2m^{-/-}$  ASBT-OVA und  $\beta 2m^{-/-}$  TF-OVA Chimären wurden die Zellen aus den inguinalen (ing LK), mesenterialen (mes LK) und Leberlymphknoten (Leber LK) sowie Leber und Milz isoliert und mittels Durchflusszytometrie auf die Anwesenheit von CFSE<sup>+</sup> Zellen überprüft. Dargestellt sind repräsentative Histogramme mit dem Gate auf CD8<sup>+</sup>V $\alpha$ 2<sup>+</sup> Zellen von n=4/Gruppe.

#### 4.2.5.2 Unvollständige Aktivierung von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in $\beta 2m^{-/-}$ ASBT-OVA und $\beta 2m^{-/-}$ TF-OVA Chimären

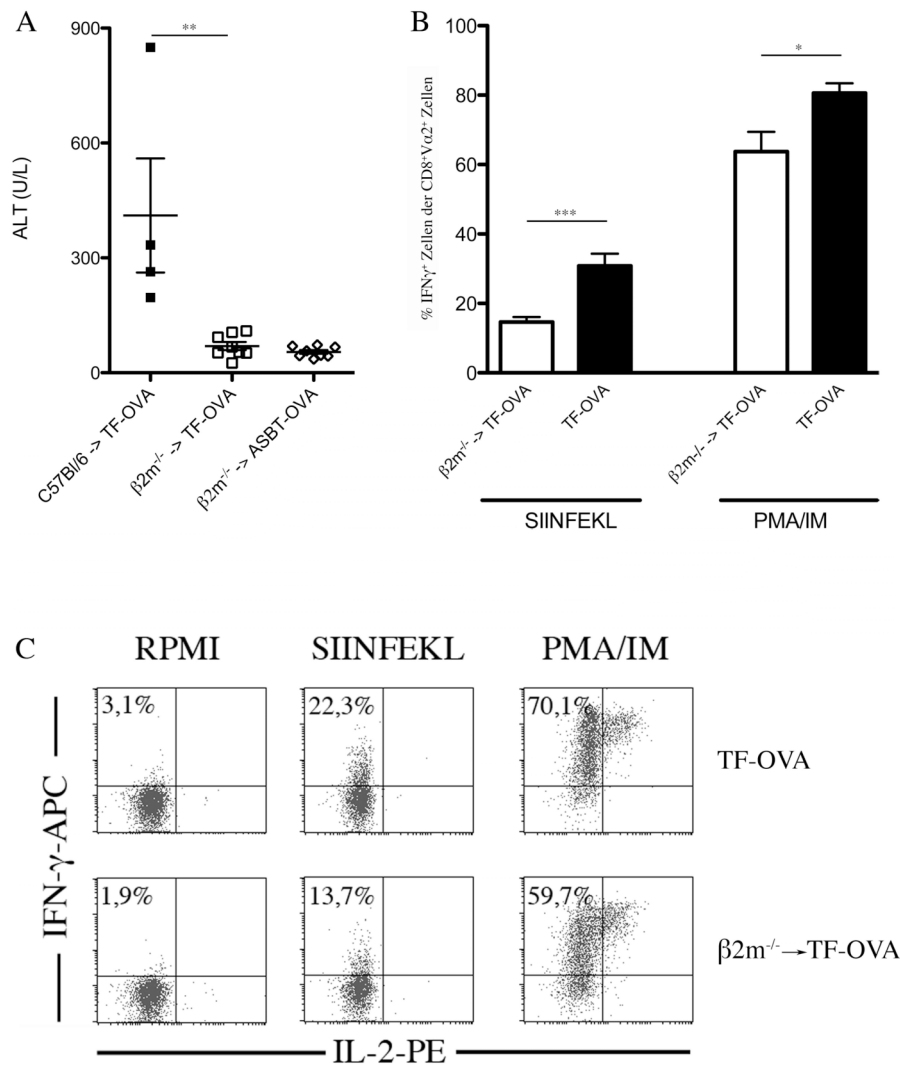
Da Proliferation nicht unbedingt mit dem Erlangen von Effektorfunktionen gleichzusetzen ist, wurde überprüft, ob in  $\beta 2m^{-/-}$  ASBT-OVA und  $\beta 2m^{-/-}$  TF-OVA Chimären durch den Transfer von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen Hepatitis induziert werden kann. Die Effektorfunktion wurde durch die Messung der ALT-Werte sowie die Fähigkeit zur Zytokinproduktion bestimmt.

Um auszuschließen, dass durch die Bestrahlung die Fähigkeit der Antigenpräsentation anderer Zellen vermindert wurde, wurden TF-OVA Mäuse nach der Bestrahlung mit C57Bl/6 Knochenmark rekonstituiert (C57Bl/6 $\rightarrow$ TF-OVA). In diesen Tieren konnte durch OT-I CD8 T-Zelltransfer eine Hepatitis ausgelöst werden, was durch den deutlichen Anstieg der ALT gekennzeichnet war ( $410,9 \pm 149$  U/L). Am Tag 5, in den vorangegangenen Versuchen der Höhepunkt der Hepatitis, wurde in  $\beta 2m^{-/-}$  TF-OVA Mäusen nur ein sehr geringer Anstieg der ALT-Werte auf  $69,7 \pm 10,6$  U/L nachgewiesen. Im Vergleich dazu wurde in  $\beta 2m^{-/-}$  ASBT-OVA Mäusen kein Unterschied bezüglich der ALT-Werte zu nicht-chimären ASBT-OVA Mäusen festgestellt ( $54,4 \pm 5$  U/L) (Abb. 12A).

Um die vermutlich unvollständige Aktivierung der OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in  $\beta 2m^{-/-}$  TF-OVA Chimären weiter zu charakterisieren, wurde die Zytokinproduktion der aus der Leber reisolierten Zellen untersucht. Dazu wurden OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in TF-OVA Mäuse und  $\beta 2m^{-/-}$  TF-OVA Chimären transferiert, sechs Tage später wurden die IHL isoliert und restimuliert. Anschließend wurde durch die intrazelluläre Färbung von IFN- $\gamma$  und IL-2 die Zytokinproduktion der antigenspezifischen

CD8<sup>+</sup>Vα2<sup>+</sup> Zellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die in den Lebern von β2m<sup>-/-</sup>→TF-OVA Chimären aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine signifikant verringerte Fähigkeit aufwiesen, nach der Restimulation mit SIINFEKL (β2m<sup>-/-</sup>→TF-OVA 14,7 ± 1,4 % vs. TF-OVA 30,9 ± 3,5 %) oder mit PMA/IM (β2m<sup>-/-</sup>→TF-OVA 63,8 ± 5,7 % vs. TF-OVA 80,6 ± 2,8 %) IFN-γ zu produzieren (Abb. 12B, C).

Diese Ergebnisse belegen, dass knochenmarkabhängige APZ zur vollständigen Aktivierung von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch ein von Hepatozyten exprimiertes Antigen notwendig sind.



**Abb. 12: Unvollständige Effektorfunktion von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in β2m<sup>-/-</sup>→ASBT-OVA und β2m<sup>-/-</sup>→TF-OVA Chimären.**

Der ALT-Wert wurde fünf Tage nach Zelltransfer von 8x10<sup>6</sup> OT-I CD8<sup>+</sup> Zellen in β2m<sup>-/-</sup>→ASBT-OVA, β2m<sup>-/-</sup>→TF-OVA und C57Bl/6→TF-OVA Chimären bestimmt. Die absoluten ALT-Werte (n=4-8) ±SEM sind dargestellt (A). Sechs Tage nach dem Transfer von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in TF-OVA Mäuse und β2m<sup>-/-</sup>→TF-OVA Chimären wurden aus der Leber IHL aufgereinigt und *in vitro* unstimuliert inkubiert oder mit SIINFEKL bzw. PMA/IM restimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte (±SEM) IFN-γ<sup>+</sup> Zellen nach Restimulation mit SIINFEKL oder PMA/IM (B) sowie repräsentative Plots mit dem Gate auf CD8<sup>+</sup>Vα2<sup>+</sup> Zellen von n=6/Gruppe (C) (\* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; Mann-Whitney-Test).

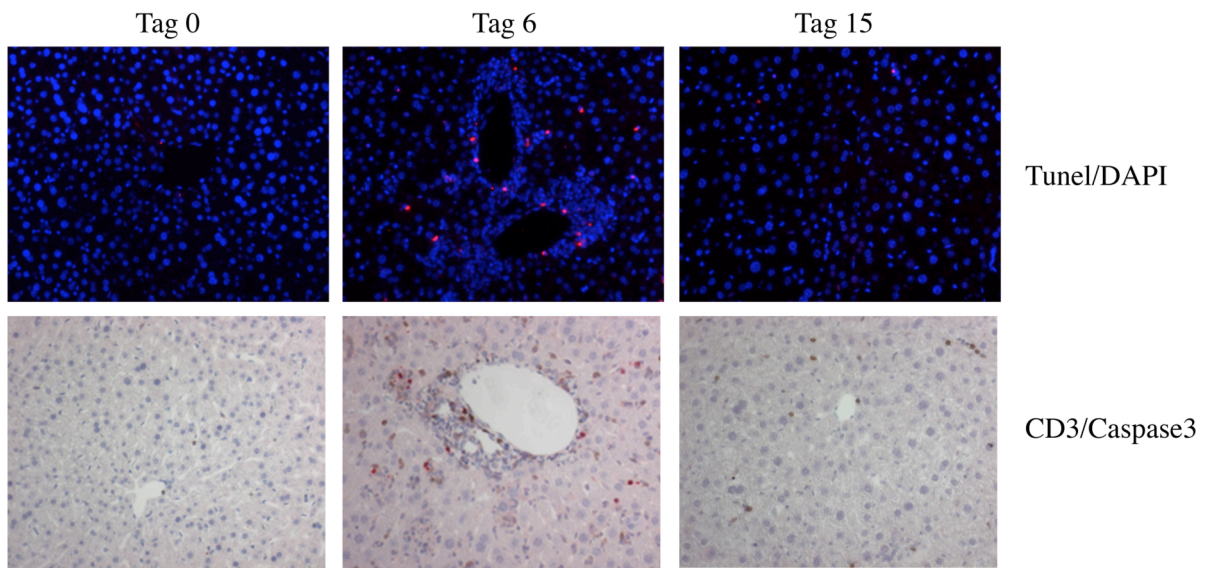
#### 4.2.6 Apoptose der OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber

Die Leber trägt durch periphere Deletion aktivierter Zellen zur systemischen Toleranz bei. Dabei akkumulieren peripher oder in der Leber selbst aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen antigenabhängig oder -unabhängig in der Leber und werden durch Apoptose deletiert (Bertolino, et al., 2001; Bertolino, et al., 1995; Huang, et al., 1994; John and Crispe, 2004; Mehal, et al., 2001; Mehal, et al., 1999; Qian, et al., 1997). Nach dem Transfer von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in TF-OVA Mäuse wurde ein transientser Anstieg der Zellzahl, des Leberinfiltrates und der Effektorfunktion beobachtet. Die Zellen wurden aktiviert, proliferierten und führten zur Schädigung der Leber. Allerdings hatte sich die Leber nach zwei Wochen wieder regeneriert.

Um den Verbleib der OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in TF-OVA Mäusen zu untersuchen, wurde die Leber zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Transfer entnommen und histologisch mittels der Färbung von CD3/Caspase 3 und TUNEL Assay (Terminal deoxynucleotidyl transferase - mediated dUTP nick end labeling) auf apoptotische Zellen untersucht (Abb. 13).

Sowohl der extrinsische als auch der intrinsische Weg zur Induktion von Apoptose resultiert in der Aktivierung von Caspase 3, die als zentrale Effektorcaspase die Degradation von DNA und Proteinen induziert. Die Untersuchungen zur aktivierten Caspase 3 zeigten, dass in der unbehandelten Leber einige wenige CD3<sup>+</sup> Zellen, aber kaum Caspase 3<sup>+</sup> Zellen zu finden waren. Ein Anstieg der apoptotischen CD3<sup>+</sup>Caspase 3<sup>+</sup> Zellen war am Tag 6 nach dem Zelltransfer zu beobachten. Am Tag 15 waren in der Leber verteilt CD3<sup>+</sup> Zellen nachzuweisen, aber kaum noch aktivierte Caspase 3<sup>+</sup> Zellen zu finden.

Ein Merkmal der Apoptose ist die Fragmentation der zellulären DNA durch Endonukleasen. Der Nachweis freier DNA 3'-Hydroxylenden erfolgte durch den TUNEL-Assay. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde zusätzlich eine DAPI-Färbung durchgeführt. Ähnlich wie bei der Kinetik der aktivierten Caspase 3<sup>+</sup> Zellen verhielt es sich bei TUNEL<sup>+</sup> Zellen in der Leber. In der unbehandelten Leber gab es nur vereinzelte apoptotische Zellen. Sechs Tage nach Zelltransfer war eine deutliche Zunahme von TUNEL<sup>+</sup> Zellen zu beobachten und ein erhöhter Anteil apoptotischer Zellen im Infiltrat zu beobachten. Zwei Wochen nach dem Zelltransfer waren in der Leber kaum noch apoptotische Zellen zu finden.



**Abb. 13: Apoptose.**

Sechs bzw. 15 Tage nach Transfer von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in TF-OVA Mäuse wurden die Lebern entfernt und für die histologische Analyse aufgearbeitet. Die Lebern unbehandelter Tiere (Tag 0) wurden als Kontrolle mitgeführt. Dargestellt sind repräsentative Bilder der Lebern von n=4/Gruppe mit Färbungen für TUNEL/DAPI und CD3 (braun, Membranfärbung)/Caspase 3 (rot, intrazelluläre Färbung).

#### 4.2.7 Die Rolle endogener CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei der durch OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen induzierten Hepatitis in TF-OVA Mäusen

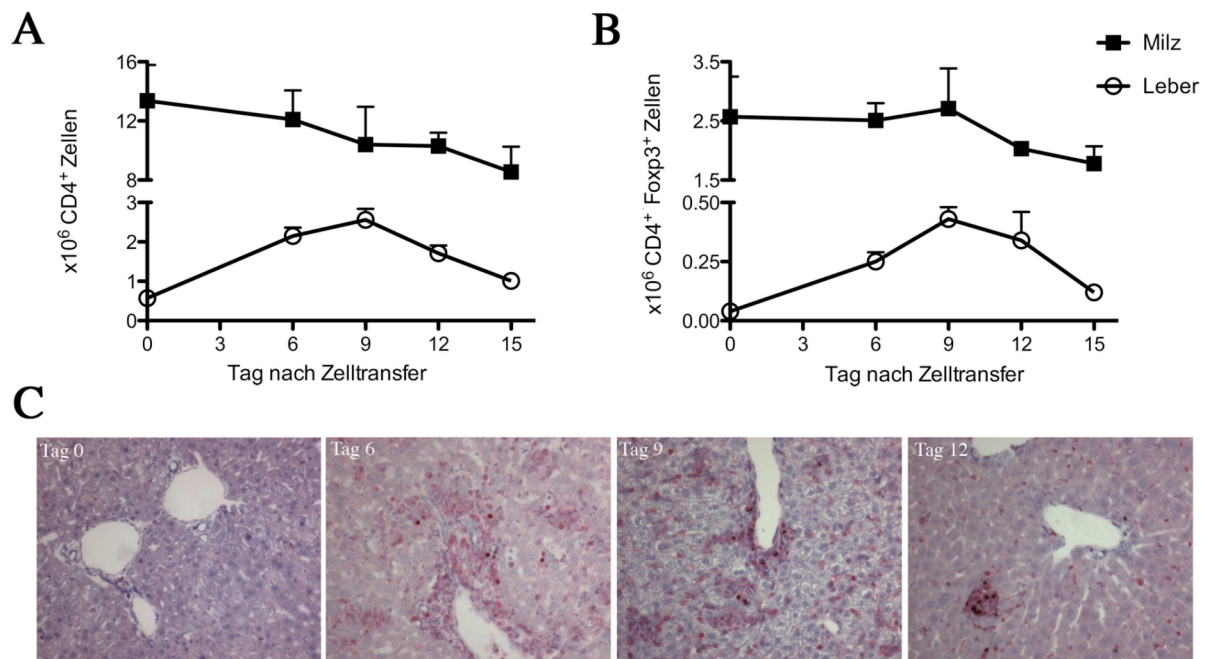
##### 4.2.7.1 Akkumulation von CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Zellen in der Leber von TF-OVA Mäusen

Um die Rolle endogener CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei der durch OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen ausgelösten Hepatitis in TF-OVA Mäusen zu ermitteln, wurde überprüft, ob der Transfer von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen einen Einfluss auf die absolute Zellzahl der CD4<sup>+</sup> Zellen hat.

Die Untersuchungen zeigten, dass nach dem Transfer von OT-I CD8<sup>+</sup> Zellen die Anzahl der CD4<sup>+</sup> Zellen in der Leber transient anstieg. Sie erhöhte sich am Tag 9 auf das Sechsfache des Ausgangswertes (von  $0,4 \pm 0,2 \times 10^6$  auf  $2,5 \pm 0,3 \times 10^6$ ). In der Milz dagegen verringerte sich die Anzahl der CD4<sup>+</sup> Zellen im Verlauf der Hepatitis von  $13 \pm 2,4 \times 10^6$  auf  $10,4 \pm 2,6 \times 10^6$  am Tag 9 (Abb. 14). Der Anteil der Foxp3<sup>+</sup> Zellen an diesen CD4<sup>+</sup> Zellen stieg in der Leber ebenfalls transient an. Die absolute Zellzahl der CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Zellen erhöhte sich von  $0,04 \pm 0,02 \times 10^6$  auf  $0,43 \pm 0,05 \times 10^6$  am Tag 9. In der Milz blieb die Zahl der CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Zellen konstant ( $2,6 \pm 0,7 \times 10^6$  am Tag 0,  $2,7 \pm 0,7 \times 10^6$  am Tag 9) (Abb. 14B).

Des Weiteren wurde der Anstieg der Foxp3<sup>+</sup> Zellen durch die histologische Untersuchung in der Leber bestätigt. Die CD3<sup>+</sup> Zellen sind membranständig rot und die Foxp3<sup>+</sup> Zellen intranuklear braun dargestellt. Foxp3<sup>+</sup> Zellen fanden sich vermehrt innerhalb der CD3<sup>+</sup> T-Zell-Infiltrate an den Tagen 6 und 9 sowie in den verbleibenden CD3<sup>+</sup> Zell-Haufen am Tag 12 (Abb. 14C).

Es wurde in den Abschnitten 4.2.6 und 4.2.7.1 dargestellt, dass nach dem Transfer von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen der Anteil von Caspase 3<sup>+</sup> und TUNEL<sup>+</sup> Zellen im periportalen Infiltrat sowie die Anzahl von CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Zellen in der Leber im Verlauf der durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen induzierten Hepatitis ansteigt. Aufgrund dieser Ergebnisse kann festgestellt werden, dass in TF-OVA Mäusen durch die peripheren Toleranzmechanismen der Apoptose aktivierter Zellen und durch CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen die induzierte Hepatitis limitiert wird.



**Abb. 14: Regulatorische T-Zellen akkumulieren in der Leber von TF-OVA Mäusen während der durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen induzierten Hepatitis.**

Nach dem Transfer von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in TF-OVA Mäuse wurden die Zellen an den angegebenen Tagen aus Leber und Milz isoliert, die Zellzahl bestimmt und mittels Durchflusszytometrie auf die Anwesenheit von CD4<sup>+</sup> und Foxp3<sup>+</sup> Zellen überprüft. Dargestellt ist der Mittelwert ( $\pm$  SEM) der absoluten Zellzahl von CD4<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Zellen von n = 4-8 (A, B). Für die histologische Analyse wurden TF-OVA Mäusen nach Transfer von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen die Lebern entfernt und aufgearbeitet. Dargestellt sind repräsentative Bilder der Lebern von n=3-4 mit immunohistochemischer Färbung für CD3 (rot, Membranfärbung) und Foxp3 (braun, intranukleare Färbung) mit 200x Vergrößerung am Tag 0 und 400x Vergrößerung am Tag 3 – 12 (C).

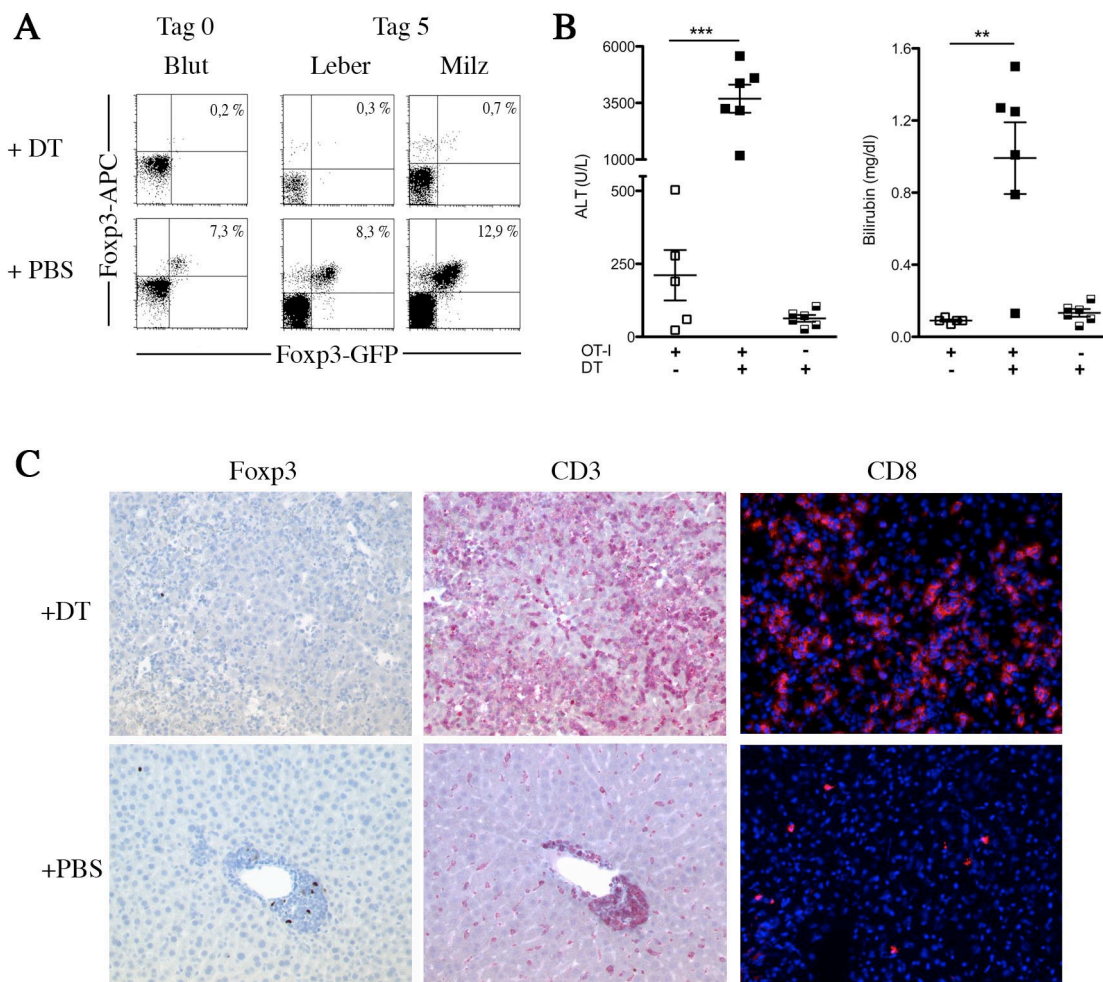
#### 4.2.7.2 Depletion der Foxp3<sup>+</sup> Zellen führt zur unkontrollierten Ausbreitung der OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in TF-OVAxDEREG Mäusen und zur Verstärkung der Hepatitis

Bisher konnte gezeigt werden, dass die induzierte Hepatitis einen transienten Verlauf hat und dass CD4<sup>+</sup> Zellen, insbesondere CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen, in der Leber akkumulieren. Deshalb stellte sich als nächstes die Frage, ob es möglich ist, dass diese endogenen CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Zellen die Immunantwort regulieren und für den transienten Verlauf der Hepatitis verantwortlich sind.

Um diese Frage beantworten zu können, wurden TF-OVA Mäuse mit DEREG Mäusen gekreuzt. Der Stamm DEREG („depletion of regulatory T cell“) exprimiert mit Hilfe eines bakteriellen künstlichen Chromosoms ein Fusionsprotein aus dem humanen Diphtherie Toxin Rezeptor und „enhanced Green Fluorescent Protein“ (eGFP) unter der Kontrolle des *foxp3* Genlokus (Lahl, et al., 2007). Durch

Injektion von Diphtherie Toxin (DT) können spezifisch  $\text{Foxp3}^+\text{GFP}^+$  Zellen depletiert werden und anhand der GFP-Expression kann die Depletion verfolgt werden. Um das Ausmaß der Hepatitis zu bewerten, wurde vor Versuchsbeginn und am Tag 5 Blut entnommen und der ALT-Wert sowie der Bilirubin-Wert im Plasma bestimmt.

Es zeigte sich, dass  $\text{Foxp3}^+\text{GFP}^+$  Zellen durch die Injektion von DT effizient depletiert wurden (Abb. 15A, C). Die Depletion von  $\text{Foxp3}^+$  Zellen vor dem Transfer der OT-I  $\text{CD8}^+$  T-Zellen resultierte in einer dramatischen Expansion der  $\text{CD8}^+$  T-Zellen in der Leber (Abb. 15C). Sowohl die ALT-Werte als auch die Bilirubin-Werte im Plasma stiegen um ein Vielfaches im Vergleich zu der mit PBS behandelten Gruppe an (Abb. 15B).  $\text{Foxp3}^+$  Zellen sind demnach bereits während der Aktivierungsphase essentiell notwendig zur Regulation der durch OT-I  $\text{CD8}^+$  T-Zellen ausgelösten Hepatitis.



**Abb. 15:  $\text{Foxp3}^+$  Zellen regulieren die durch  $\text{CD8}^+$  T-Zellen induzierte Hepatitis.**

Die Depletion der  $\text{Foxp3}^+\text{GFP}^+$  Zellen durch Injektion von DT wurde vor Zelltransfer am Tag 0 im peripheren Blut und am Tag 5 zusätzlich in Leber und Milz von TF-OVAXDEREG überprüft. Es sind dargestellt repräsentative Plots mit dem Gate auf  $\text{CD4}^+$  Zellen (A). Vier bzw. fünf Tage nach Transfer von  $\text{Rag1}^{-/-}$  OT-I  $\text{CD8}^+$  T-Zellen in TF-OVAXDEREG Mäuse wurden die ALT- und Bilirubin-Werte im Plasma bestimmt sowie die Lebern entfernt und für die histologische Analyse aufgearbeitet. In (B) sind die individuellen Werte  $\pm$ SEM, in (C) repräsentative Bilder der Lebern von  $n=5-6$ /Gruppe mit immunohistochemischer Färbung für CD3 (rot, Membranfärbung), Foxp3 (braun, intranukleare Färbung) mit 100x Vergrößerung oder Immunfluoreszenz für CD8 mit 200x Vergrößerung dargestellt (\*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; ungepaarter student's t-test).



### 4.3 Präsentation von hepatischen Antigenen und Aktivierung von OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Über die intrahepatische Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und deren Rolle bei der Immunreaktion in der Leber *in vivo* ist wenig bekannt. Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen setzt die Präsentation von Antigen im Kontext von MHC-II auf APZ voraus. In der Leber exprimieren DC, KC, LSEC und Ito-Zellen konstitutiv verschiedene Mengen von MHC-II, Adhäsionsmolekülen und kostimulatorischen, aber auch inhibitorischen Molekülen (Diehl, et al., 2008; Kamihira, et al., 2005; Knolle and Limmer, 2003; Pillarisetty, et al., 2004; Wahl, et al., 2008; Winau, et al., 2007; You, et al., 2008; Yu, et al., 2004). Die Expression der meisten dieser Moleküle wird unter inflammatorischen Bedingungen verstärkt und kann dann auch auf Cholangiozyten und Hepatozyten induziert werden (Ayres, et al., 1993; Sacher, et al., 2002).

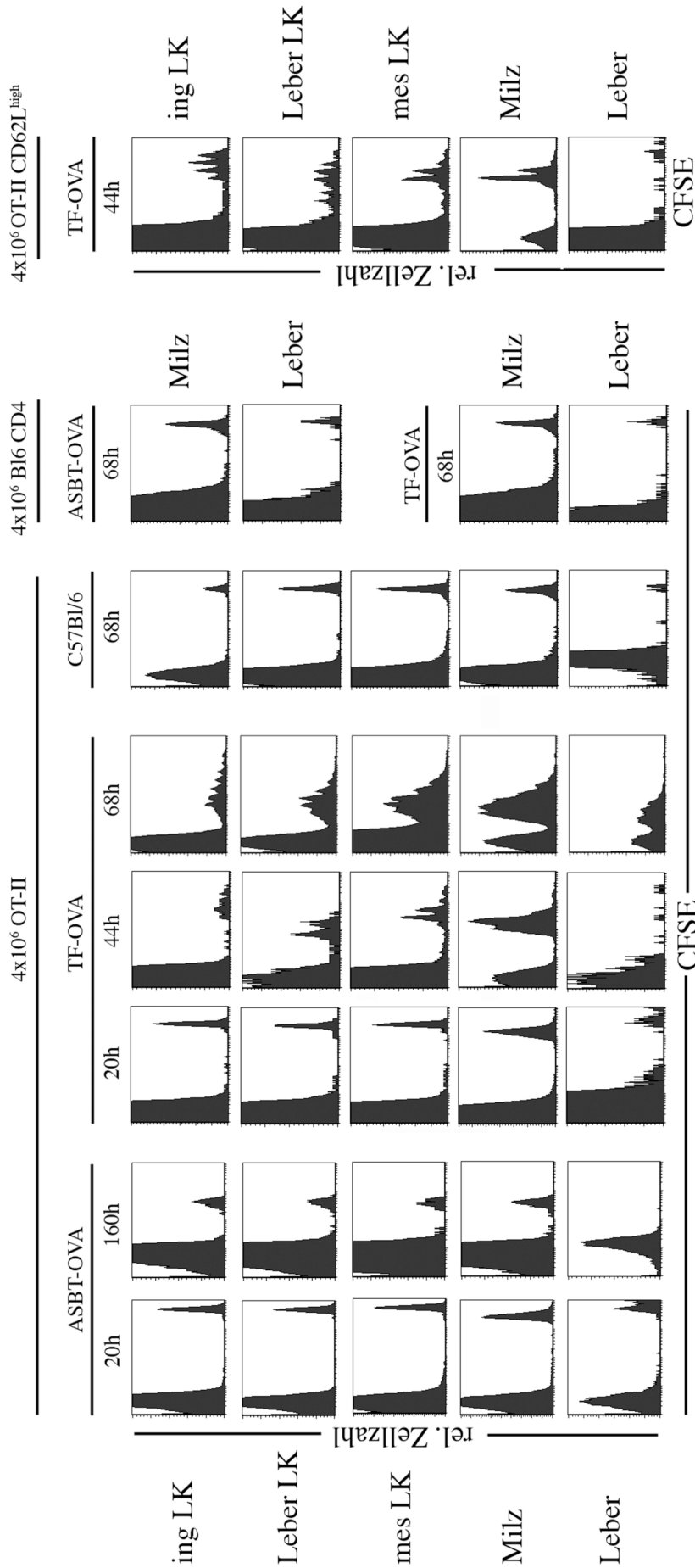
#### 4.3.1 Proliferation von OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen in ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen

Um den Einfluss der Expression von Ovalbumin in Cholangiozyten oder Hepatozyten auf die Aktivierung antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu untersuchen, wurden OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus den Lymphknoten und der Milz von OT-II Mäusen aufgereinigt, mit CFSE markiert und *i.v.* in ASBT-OVA, TF-OVA oder C57Bl/6 Mäuse injiziert. Die Proliferation in verschiedenen Organen wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Transfer von OT-II CFSE<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen in TF-OVA, ASBT-OVA und C57Bl/6 Mäuse überprüft (Abb. 16).

20h nach dem Zelltransfer verteilten sich die OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen in allen getesteten Organen und es fand weder in ASBT-OVA noch in TF-OVA Mäusen Proliferation statt. In ASBT-OVA Mäusen konnten selbst nach 160h keine proliferierenden Zellen nachgewiesen werden. Die Verringerung der Intensität von CFSE beruht nicht auf Zellteilung, sondern auf dem Verlust der Helligkeit des CFSE durch Ausbleichen im zeitlichen Verlauf. Dagegen wurde in TF-OVA Mäusen 44h nach Transfer in den Lymphknoten und besonders in der Milz, aber nicht in der Leber eine Proliferation festgestellt. Nach drei Tagen hatten sich die aktivierten Zellen umverteilt und es waren auch in der Leber CFSE<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Vα2<sup>+</sup> T-Zellen vorhanden.

Zur Überprüfung der Antigenpezifität wurden antigenspezifische OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen in C57Bl/6 Mäuse sowie unspezifische C57Bl/6 CD4<sup>+</sup> T-Zellen in ASBT-OVA und TF-OVA Mäuse transferiert. Um eine Proliferation sicher auszuschließen, erfolgte die Untersuchung der Organe in diesen Kontrollen nach 68h. Sowohl der Transfer von OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen in C57Bl/6 Mäuse als auch der Transfer von C57Bl/6 CD4<sup>+</sup> T-Zellen in ASBT-OVA und TF-OVA Mäuse führte nicht zur Aktivierung und Proliferation.

Da keine Rag1<sup>-/-</sup>OT-II Mäuse zur Verfügung standen, wurden OT-II CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>high</sup> Zellen selektioniert, um sicherzustellen, dass nur naive Zellen transferiert werden. Bei der Untersuchung der Proliferation zeigten diese Zellen nach dem Transfer in TF-OVA Mäuse das gleiche Proliferationsverhalten wie nicht weiter aufgereinigte Zellen.



**Abb. 16: Proliferation von OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen in ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen.**

Zu den angegebenen Zeitpunkten nach dem Transfer von CFSE-markierten OT-II CD4<sup>+</sup> bzw. OT-II CD4<sup>high</sup> CD62L<sup>high</sup> T-Zellen in ASBT-OVA, TF-OVA oder C57Bl/6 Mäuse wurden die Zellen aus den inguinalen (ing LK), mesenterialen (mes LK) und Leberlymphknoten (Leber LK) sowie Leber und Milz isoliert und mittels Durchflusszytometrie auf die Anwesenheit von CFSE<sup>+</sup> Zellen überprüft. Dargestellt sind repräsentative Histogramme mit dem Gate auf CD4<sup>+</sup> Va2<sup>+</sup> Zellen von n=4-6/Gruppe. Als Kontrolle wurden CFSE-markierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen, aufgereinigt aus C57Bl/6, in ASBT-OVA und TF-OVA Mäuse transfertiert. 68h nach dem Transfer wurden die Zellen aus Leber und Milz isoliert und mittels Durchflusszytometrie auf die Anwesenheit von CFSE<sup>+</sup> Zellen überprüft. Dargestellt sind repräsentative Histogramme mit dem Gate auf CD4<sup>+</sup> Zellen von n=6/Gruppe.



Die Expression von Ovalbumin in Hepatozyten führte zur Aktivierung und Proliferation antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Milz und Lymphknoten, während die Expression in Cholangiozyten die OT-II CD4<sup>+</sup> Zellen in keinem der getesteten Organe aktivierte. Da in ASBT-OVA Mäusen keine Proliferation der OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu beobachten war, wurde in den folgenden Versuchen dieser Stamm nicht weitergehend untersucht.

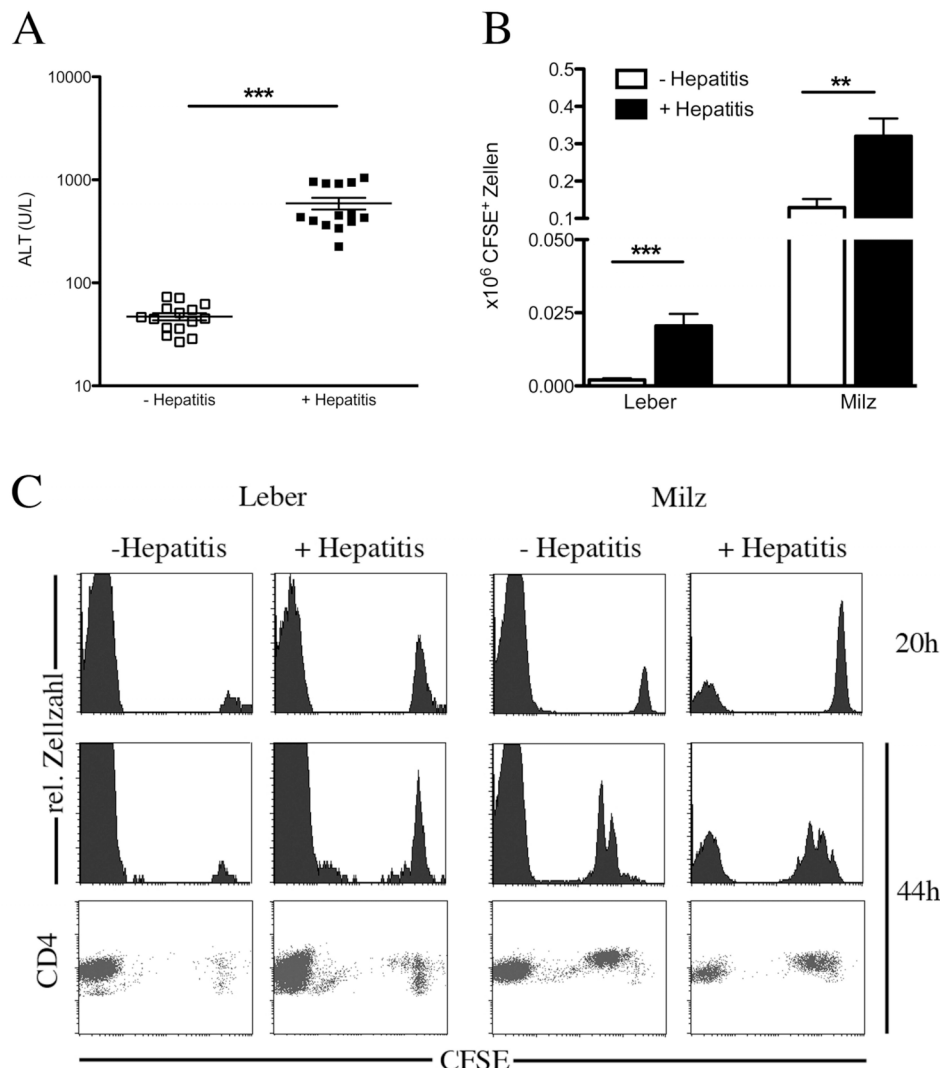
#### **4.3.2 Präsentation von Ovalbumin für OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber im entzündlichen Kontext**

In Hepatozyten wird im Verlauf einer chronischen Entzündung die Expression von MHC-II Molekülen induziert (Chu and Liaw, 1993; Toyonaga, et al., 1994). *In vitro*-Daten zeigten, dass MHC-II exprimierende Hepatozyten (Herkel, et al., 2003) oder Leber-APZ (Wiegard, et al., 2005) in der Lage sind, CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu aktivieren.

Im Folgenden galt es zu klären, ob eine durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen bedingte Hepatitis die Aktivierung von OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von TF-OVA Mäusen begünstigt. Durch den Transfer von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde zunächst eine Hepatitis induziert. Die Messung der ALT-Werte bestätigte die Entzündung (+Hepatitis, ALT-Wert am Tag 6:  $592 \pm 77,4$  U/L) (Abb. 17A). Zum Höhepunkt der Hepatitis am Tag 6 wurden CFSE-markierte OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen transferiert. Die Migration und Proliferation dieser CFSE<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde 20h bzw. 44h später untersucht.

20h nach Transfer der OT-II CFSE<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigten sich signifikant erhöhte CFSE<sup>+</sup> Zellzahlen in Leber und Milz von TF-OVA Mäusen mit Hepatitis im Vergleich zu TF-OVA Mäusen ohne Hepatitis (Leber +Hepatitis  $2,05 \pm 0,41 \times 10^4$  vs. Leber -Hepatitis  $0,21 \pm 0,05 \times 10^4$ , Milz +Hepatitis  $32,04 \pm 4,76 \times 10^4$  vs. Milz -Hepatitis  $12,95 \pm 2,28 \times 10^4$ ) (Abb. 17B, C). 44h nach Transfer der OT-II CFSE<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen proliferierten die Zellen in TF-OVA Mäusen ohne Hepatitis wie bereits zuvor beschrieben (Abb. 16) in der Milz, jedoch nicht in der Leber. Die Proliferation in der Leber von TF-OVA Mäusen mit Hepatitis war zu diesem Zeitpunkt nur geringfügig verstärkt (Abb. 17C). Zur besseren Veranschaulichung sind diese Ergebnisse sowohl als Histogramm als auch als Dot Plot dargestellt.

Die Migration der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in die Leber ist also erhöht, wenn in der Leber eine Entzündung vorliegt, aber die Proliferation in der Leber verstärkt sich nur unwesentlich. Demnach erhöht die durch OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen induzierte Hepatitis die Antigenpräsentation in der Leber nicht ausreichend, um eine Aktivierung von OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu ermöglichen.



**Abb. 17: Präsentation von Ovalbumin für OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber im entzündlichen Kontext.**

Keine (-Hepatitis) oder  $8 \times 10^6$  OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen (+Hepatitis) wurden *i.v.* in TF-OVA Mäuse transferiert. In (A) sind die ALT-Werte am Tag 6  $\pm$ SEM dargestellt. (\*\*\*) =  $p < 0,001$ ; Mann-Whitney-Test). CFSE-markierte OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden am Tag 6 *i.v.* in TF-OVA Mäuse (+Hepatitis) oder TF-OVA Mäuse (-Hepatitis) transferiert und weitere 20h oder 44h später aus Leber und Milz Zellen isoliert, die Zellzahl bestimmt und mittels Durchflusszytometrie auf das Vorhandensein von CFSE<sup>+</sup> Zellen analysiert (B, C). Dargestellt sind in (B) der Mittelwert  $\pm$ SEM der absoluten Zellzahl CFSE<sup>+</sup> Zellen in Leber und Milz und in (C) repräsentative Histogramme/Dot Plots mit dem Gate auf CD4<sup>+</sup>V $\alpha$ 2<sup>+</sup> Zellen von n=6/Gruppe (\*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; ungepaarter student's t-test).

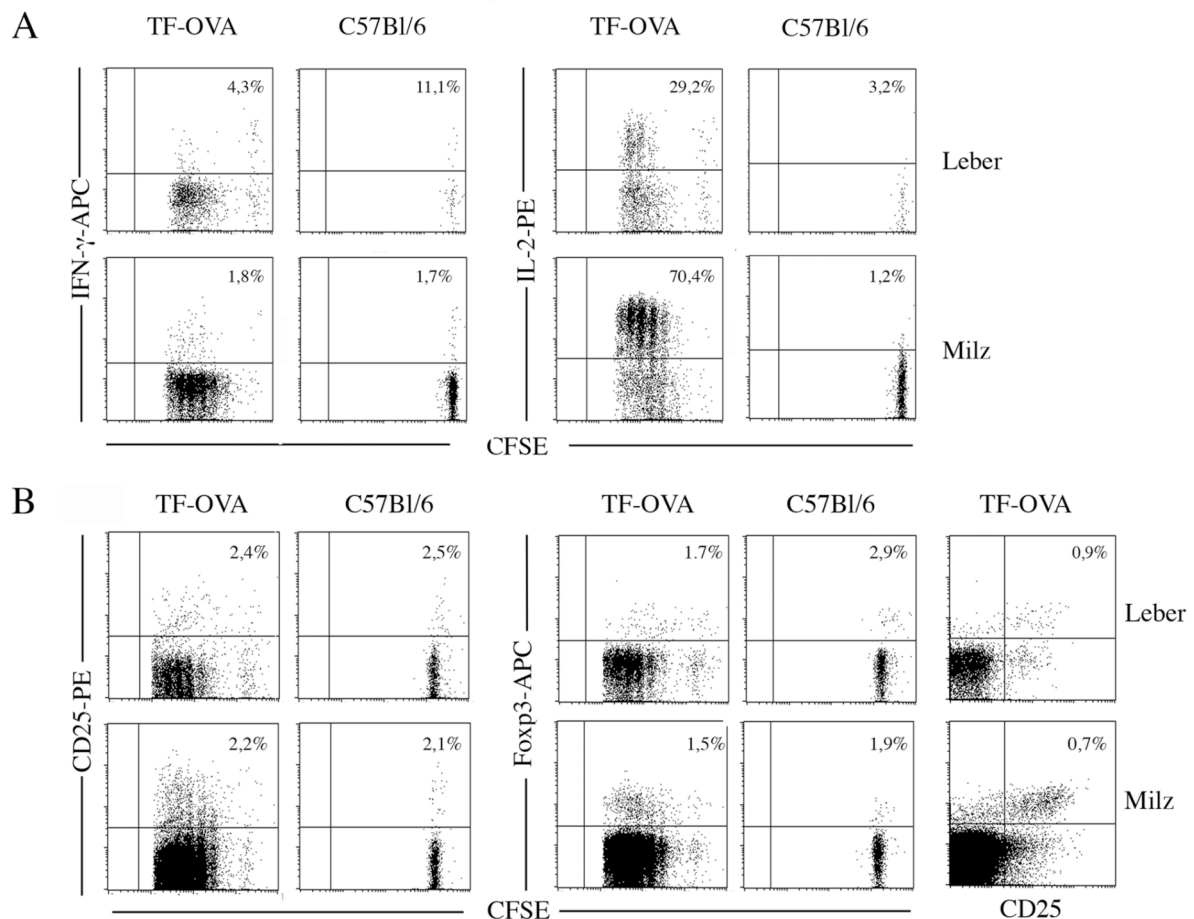
#### 4.3.3 Phänotyp der in TF-OVA Mäusen aktivierten OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Da die OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach dem Transfer in TF-OVA Mäuse in der Milz und den Lymphknoten aktiviert werden und proliferieren, wurde untersucht, ob sie auch in der Lage sind, zu Effektorzellen zu differenzieren. Dazu wurden CFSE-markierte OT-II CD4<sup>+</sup> Zellen in TF-OVA und C57Bl/6 Mäuse transferiert, 68h später aus Leber und Milz reisoliert, und die Expression von CD25 und Foxp3 sowie die Zytokinproduktion nach Restimulation wurden charakterisiert.

Der Anteil von CFSE<sup>+</sup> Zellen, die nach Restimulation IL-2 zu produzierten, betrug 70-80% in der Milz bzw. 25-45% in der Leber. Allerdings war nur ein geringer Teil der Zellen in der Lage, IFN- $\gamma$  zu

produzieren (1-2% in der Milz, 4-9% in der Leber) (Abb. 18A). 68h nach Zelltransfer waren kaum CFSE<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen in Leber oder Milz nachweisbar. Zusätzlich zu CD25 wurde die Expression von Foxp3 untersucht. Auch der Anteil von CFSE<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Zellen erhöhte sich nur geringfügig. Weniger als 1% der CFSE<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen exprimierten gleichzeitig CD25 und Foxp3 (Abb. 18B).

Das bedeutet, dass die antigenabhängige Aktivierung von OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz von TF-OVA weder einen Th1-Effektorphänotyp noch einen regulatorischen Phänotyp induziert.



**Abb. 18: Phänotyp der in TF-OVA Mäusen aktivierten OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen.**

68h nach Transfer von CFSE-markierten OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen in TF-OVA und C57Bl/6 Mäuse wurden die Zellen aus Leber und Milz isoliert und die IFN- $\gamma$  und IL-2 Produktion nach *in vitro*-Restimulation mit PMA/IM (A) oder direkt die CD25 und Foxp3 Expression der CD4<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> Zellen analysiert (B). Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse mit dem Gate auf CD4<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> Zellen von n=6/Gruppe.

#### 4.3.4 OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen verstärken nicht die durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen induzierte Hepatitis in TF-OVA Mäusen

Die Lebern von Patienten mit AIH weisen ein gemischtes mononukleäres Infiltrat bestehend aus B-Lymphozyten, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie Makrophagen und Plasmazellen auf. Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen überwiegen im portalen Bereich des Infiltrates (Eggink, et al., 1982; Hashimoto, et al., 1993; Vergani, et al., 2009). Zunächst wurde vermutet, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen die gewebeschädigende

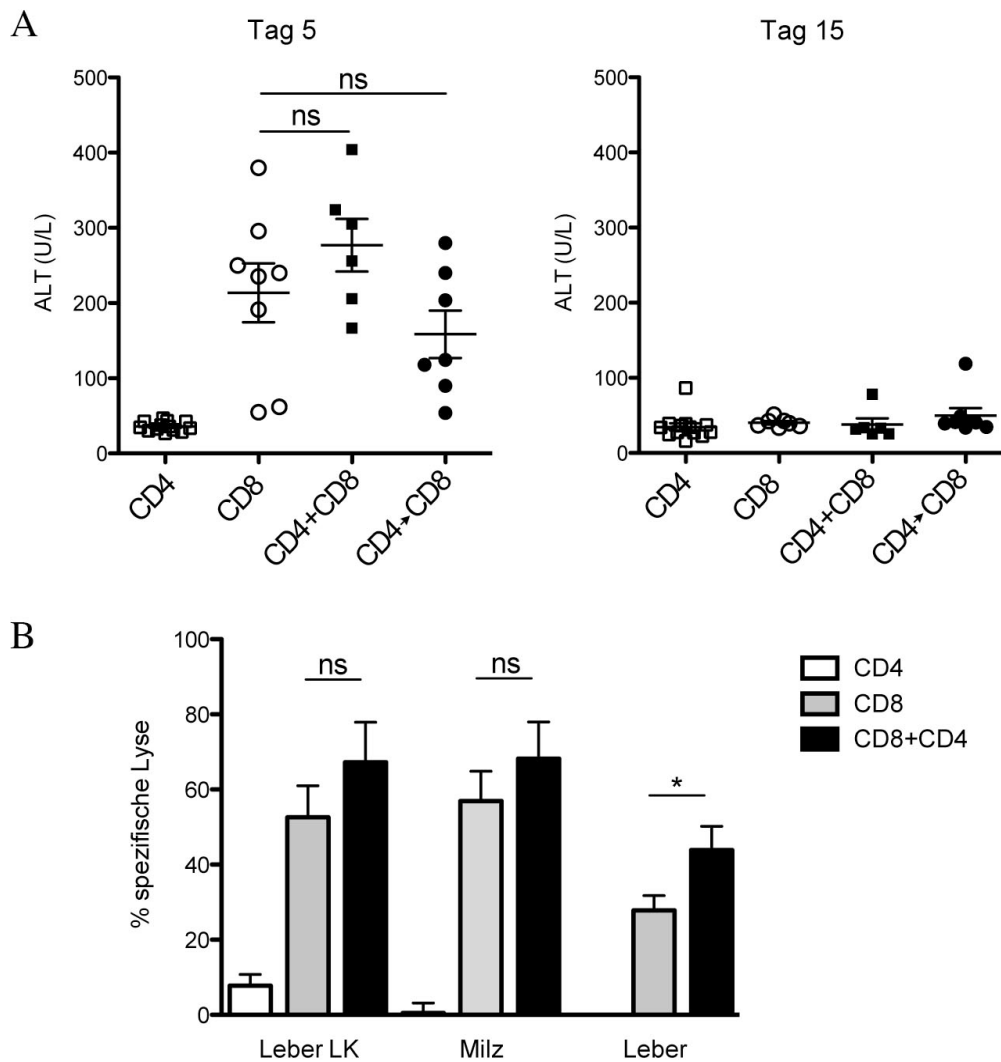
Haupteffektorpopulation in der Leber darstellen (Lohr, et al., 1994; Schlaak, et al., 1993; Senaldi, et al., 1992). Alternativ dazu könnten sie nicht selbst zellschädigend sein, sondern CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit Hilfe versehen.

Deshalb wurde als nächstes untersucht, ob in TF-OVA Mäusen durch den Transfer von antigenspezifischen OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine Hepatitis induziert werden kann und ob der gleichzeitige oder versetzte Kotransfer von OT-II CD4<sup>+</sup> mit OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen die durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen bedingte Hepatitis verstärkt. Beim versetzten Kotransfer erfolgte der Transfer der OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen drei Tage nach dem der OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen, da aus vorherigen Untersuchungen ermittelt wurde, dass zu diesem Zeitpunkt CD4<sup>+</sup> T-Zellen auch tatsächlich in die Leber eingewandert sind (siehe Abb. 16) und CD8<sup>+</sup> T-Zellen zum Zeitpunkt ihrer Aktivierung Hilfe leisten könnten. Nach dem Zelltransfer wurde die Auswirkung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf die Hepatitis durch die Messung des Enzyms ALT und einen *in vivo* Zytolyse Assay bewertet.

Der Transfer von OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen induzierte, gemessen am ALT-Wert, keine Hepatitis ( $35,9 \pm 1,7$  U/L) (Abb. 19A). Weder der gleichzeitige noch der versetzte Transfer von CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte die durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen bedingte Hepatitis signifikant verstärken oder verlängern. Beim Transfer von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen allein (CD8) lag der ALT-Wert am Tag 5 bei  $213,7 \pm 39,1$  U/L. Durch den gleichzeitigen Kotransfer (CD4+CD8) erhöht sich der ALT-Wert geringfügig auf  $276,9 \pm 35,0$  U/L, wogegen der versetzte Transfer (CD4→CD8) eher eine Erniedrigung der ALT-Werte auf  $158,5 \pm 31,6$  U/L zur Folge hatte.

Mit Hilfe des *in vivo* Zytolyse Assays wurde zusätzlich überprüft, ob sich die CD8 Effektorfunktion durch CD4 Hilfe verstärkt. Dazu wurden entweder OT-II CD4<sup>+</sup> oder OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen allein bzw. OT-II CD4<sup>+</sup> und OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen gemeinsam transferiert. Sechs Tage nach Zelltransfer wurde die zytolytische Aktivität untersucht. Wie aus Abb. 19B erkennbar ist, führten OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen allein erwartungsgemäß nicht zur Zytolyse. In den Leberlymphknoten oder der Milz hatten OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen keinen signifikanten Einfluss auf die CD8 Effektorfunktion. Die spezifische Lyse erhöhte sich geringfügig in den Lymphknoten von  $52,6 \pm 8,4\%$  (CD8) auf  $67,3 \pm 10,6\%$  (CD4+CD8) und in der Milz von  $56,9 \pm 7,9\%$  (CD8) auf  $68,2 \pm 9,8\%$  (CD4+CD8). In der Leber wurde jedoch ein signifikanter Anstieg der Effektorfunktion durch den Kotransfer erzielt (von  $27,8 \pm 3,9\%$  auf  $43,8 \pm 6,4\%$ ) (Abb. 19B).

OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen fördern also als T-Helferzellen die Differenzierung der OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu Effektorzellen geringfügig, da der gleichzeitige Transfer von OT-II CD4<sup>+</sup> und OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in einer leichten Verstärkung der Hepatitis in TF-OVA Mäusen resultierte. Jedoch wird weder durch den gleichzeitigen noch den versetzten Transfer die Dauer der Hepatitis über den bisher beschriebenen Zeitraum von 15 Tagen hinaus verlängert.



**Abb. 19: OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen verstärken nicht die durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen induzierte Hepatitis.**

$4 \times 10^6$  OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden allein (CD4), gleichzeitig zusammen mit  $4 \times 10^6$  OT-I CD8 T-Zellen (CD4+CD8) oder drei Tage vor dem Transfer von  $4 \times 10^6$  OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen (CD4 → CD8) *i.v.* in TF-OVA Mäuse transferriert. Als Kontrolle wurden  $4 \times 10^6$  OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen allein (CD8) injiziert. Die ALT-Werte wurden fünf und 15 Tage nach Zelltransfer bestimmt. Es sind die absoluten Werte von n=6-8/Gruppe dargestellt (A) (ns = nicht signifikant, ungepaarter student's t-test).  $4 \times 10^6$  OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden allein (CD4) oder zusammen mit  $1 \times 10^6$  OT-I CD8 T-Zellen (CD4+CD8) in TF-OVA Mäuse transferriert. Als Kontrolle wurden  $1 \times 10^6$  OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen (CD8) oder keine Zellen injiziert. Sechs Tage später wurde der *in vivo* Zytolyse Assay durchgeführt. Die Zellen wurden aus den Leberlymphknoten, der Milz und Leber isoliert, die CFSE<sup>+</sup> Zellen analysiert und die spezifische Lyse berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte der spezifische Lyse in % ±SEM von n=6/Gruppe (B) (\* = p < 0,05; ns = nicht signifikant, Mann-Whitney-Test).

#### 4.4 Präsentation des hepatischen Antigens und Aktivierung von Effektor OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen

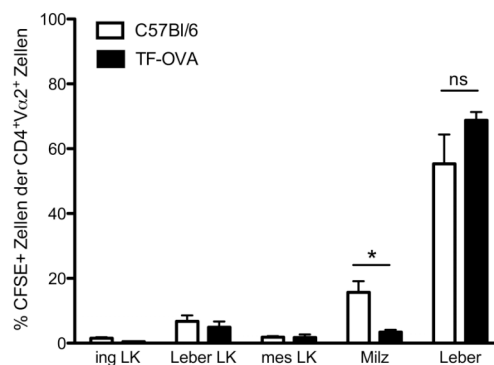
##### 4.4.1 Migration von Effektor OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen in TF-OVA und C57Bl/6 Mäusen

Wie in Abschnitt 4.3 gezeigt, wurden naive OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht in der Leber von TF-OVA Mäusen aktiviert. Deshalb wurde als nächstes der Einfluss der Expression von Ovalbumin in Hepatozyten auf das Migrationsverhalten von *in vitro* zu Th1 polarisierten Effektor OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen untersucht. Die Effektorzellen wurden wie unter 3.2.4 beschrieben generiert, mit CFSE

markiert und *i.v.* in TF-OVA und C57Bl/6 Mäusen injiziert. 20h nach dem Transfer wurde in verschiedenen lymphatischen Organen und der Leber untersucht, wieviel Prozent CFSE<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD4<sup>+</sup>Vα2<sup>+</sup> Zellpopulation vorhanden sind.

Es wurde deutlich, dass die Effektor OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen fast ausschließlich in die Leber migrierten. 68,8 ± 2,6% der CD4<sup>+</sup>Vα2<sup>+</sup> Zellen in der Leber von TF-OVA waren transferierte CFSE<sup>+</sup> Zellen. Dieser Effekt war jedoch antigenunabhängig, da sich auch in der Leber von C57Bl/6 Tieren 55,3 ± 9,1% CFSE<sup>+</sup> Zellen befanden. Ein signifikanter Unterschied bestand ausschließlich in der Milz, wo weniger CFSE<sup>+</sup> Effektorzellen in TF-OVA Mäusen (3,4 ± 0,7%) im Vergleich zu C57Bl/6 Mäusen (15,7 ± 3,5%) zu detektieren waren (Abb. 20).

*In vitro* polarisierte Effektor OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen migrierten also antigenunabhängig in die Leber. Dabei bestand jedoch eine Tendenz zum antigenabhängigen „trapping“ in der Leber von TF-OVA.



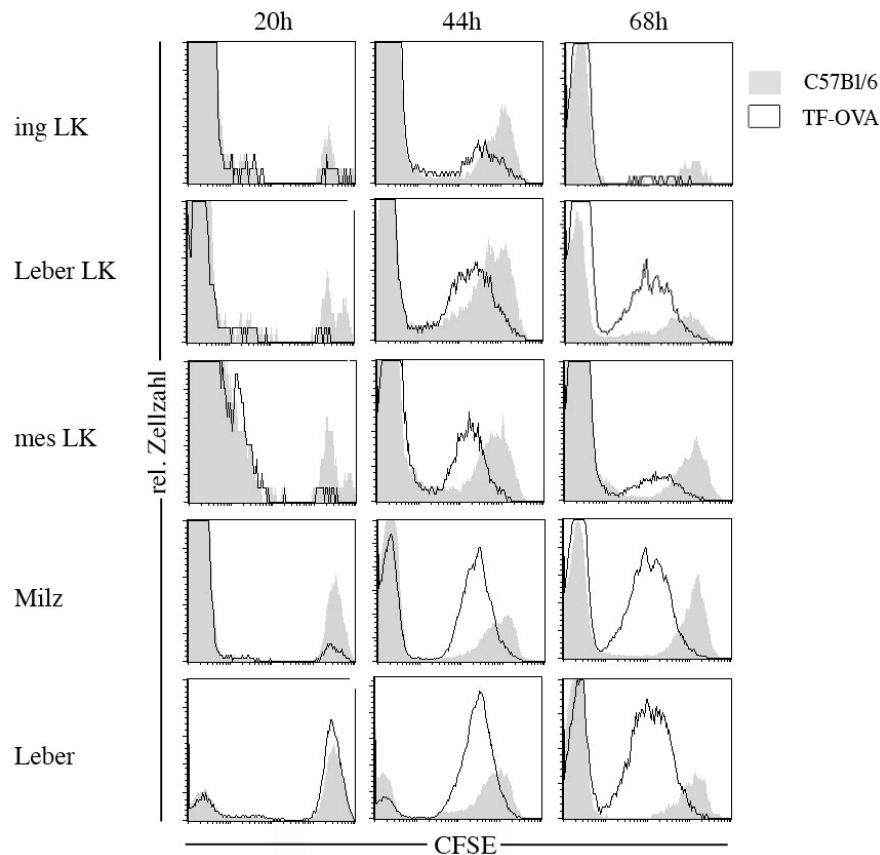
**Abb. 20: Migration von Effektor OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen in TF-OVA und C57Bl/6 Mäusen.**

20h nach dem Transfer von *in vitro* polarisierten CFSE-markierten Effektor OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen in TF-OVA und C57Bl/6 Mäuse wurden die Zellen aus den inguinalen (ing LK), mesenterialen (mes LK) und Leberlymphknoten (Leber LK) sowie Leber und Milz isoliert und mittels Durchflusszytometrie auf die Anwesenheit von CFSE<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Vα2<sup>+</sup> Zellen überprüft. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM des Anteils an CFSE<sup>+</sup> Zellen von n = 4-5/Gruppe (\* = p < 0,05; ns = nicht signifikant, ungepaarter student's t-test).

#### 4.4.2 Effektor OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen proliferieren in der Leber von TF-OVA Mäusen

Da die Zellen antigenunspezifisch in die Leber migrierten, wurde als nächstes untersucht, ob sie in Abhängigkeit vom Antigen weiterhin proliferieren können. Dazu wurden Effektor OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit CFSE markiert und in TF-OVA und C57Bl/6 Mäuse transferiert. Nach 20h, 44h oder 68h wurden die Zellen aus verschiedenen Organen reisoliert und analysiert.

20h nach Zelltransfer fand noch keine Proliferation statt, während nach 44h in allen getesteten Organen von TF-OVA Mäusen Proliferation beobachtet wurde. Dabei konnte nicht unterschieden werden, in welchem Organ der TF-OVA Mäuse die Aktivierung erfolgte. In C57Bl/6 Mäusen wurde eine antigenunspezifische und im Vergleich zu TF-OVA Mäusen deutlich verminderte Proliferation beobachtet, die kennzeichnend für Effektorzellen ist (Abb. 21).



**Abb. 21: Proliferation von Effektor OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen in TF-OVA Mäusen.**

20h, 44h und 68h nach dem Transfer von *in vitro* polarisierten CFSE-markierten Effektor OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen in TF-OVA und C57Bl/6 Mäusen wurden die Zellen aus den inguinalen (ing LK), mesenterialen (mes LK) und Leberlymphknoten (Leber LK) sowie Leber und Milz isoliert und mittels Durchflusszytometrie auf die Anwesenheit von CFSE<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Vα2<sup>+</sup> Zellen überprüft. Dargestellt sind repräsentative Histogramme mit dem Gate auf CD4<sup>+</sup>Vα2<sup>+</sup> Zellen von n = 5-6/Gruppe.

#### 4.4.3 Effektor OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen verstärken die durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen induzierte Hepatitis in TF-OVA Mäusen

Wie im Abschnitt 4.3.4 gezeigt wurde, führte der Transfer von naiven OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht zu einer wesentlichen Verstärkung der durch OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen induzierten Hepatitis in TF-OVA Mäusen. Für *in vitro* aktivierte antigenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde bereits in anderen Modellen *in vivo* Helferfunktion gezeigt (Behrens, et al., 2004; Heymann, et al., 2009). Um das genauer zu untersuchen, wurde nun überprüft, ob durch den Transfer von bereits differenzierten Effektor OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine Hepatitis induziert werden kann und ob der Kotransfer mit OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen deren Effektorfunktion und somit die durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen bedingte Hepatitis verstärkt oder verlängert. Dazu wurde die Effektorfunktion durch die Messung des Enzyms ALT und einen *in vivo* Zytolyse Assay bewertet.

Die zusammengefassten Ausgangswerte aller Tiere dieses Versuches lagen im Bereich von  $42,8 \pm 3,2$  U/L (nicht dargestellt). Der Transfer von Effektor OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen allein bewirkte, trotz der Infiltration der Leber in TF-OVA Mäusen, nur einen geringen Anstieg der ALT-Werte auf  $64,9 \pm 20,5$  U/L (Abb. 22A). Dieser ist unspezifisch, da er auch in C57Bl/6 Mäusen vorhanden war ( $52,5 \pm 10,9$

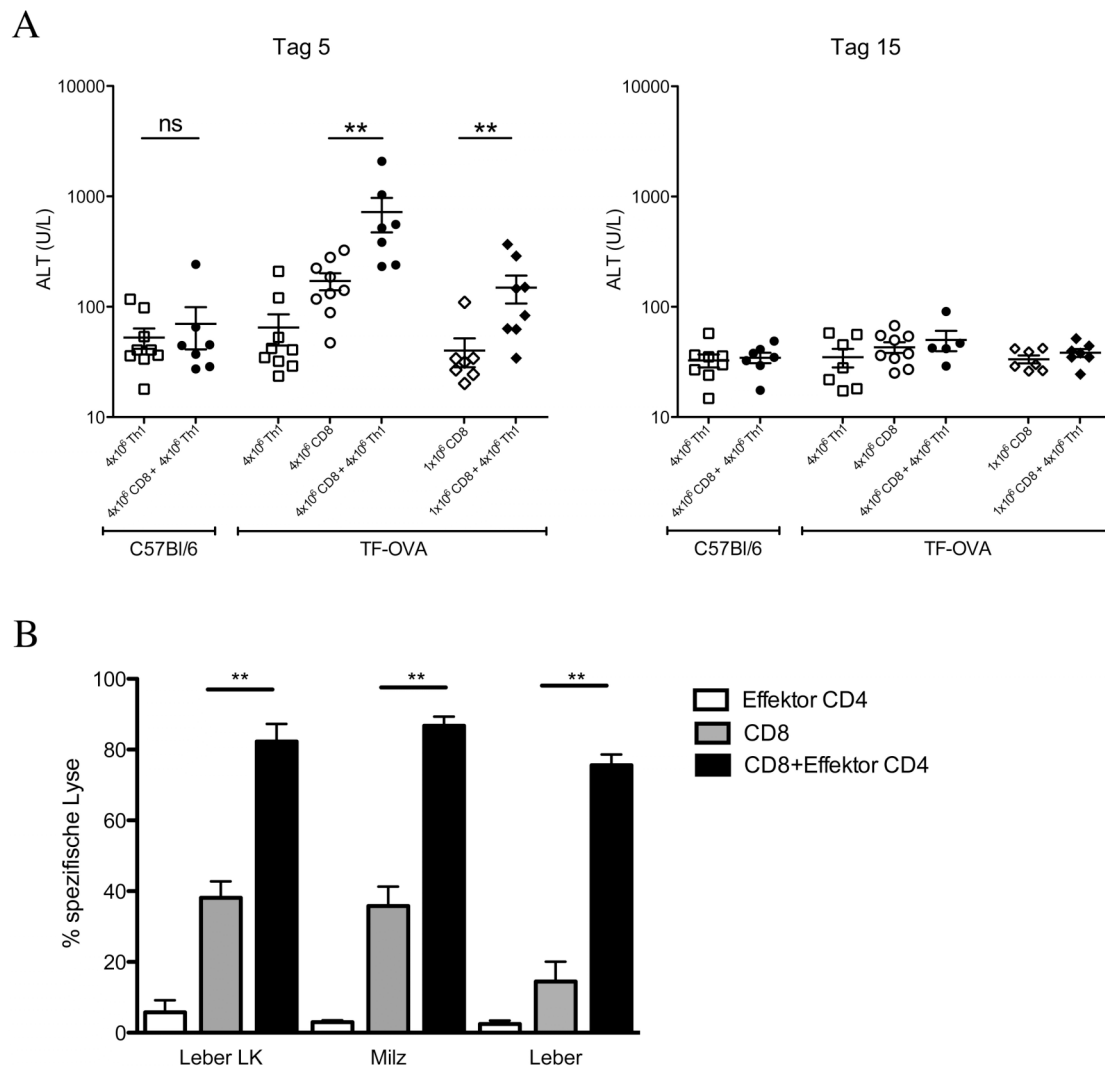
U/L). Der Kotransfer von Effektor OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen zusammen mit OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen resultierte in TF-OVA Mäusen in einem signifikanten Anstieg der ALT-Werte ( $720,8 \pm 249,1$  U/L) im Vergleich zum Transfer von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen allein ( $171,2 \pm 30,3$  U/L). Einige Tiere der Kotransfer-Gruppe ( $n = 3$ ) mit sehr hohen ALT-Werten starben im Verlauf des Versuches vermutlich an den Folgen der Hepatitis. 15 Tage nach Zelltransfer hatten sich die überlebenden Tiere regeneriert, und die ALT-Werte befanden sich nahe dem Ausgangsniveau ( $49,9 \pm 10,5$  U/L) (Abb. 22A).

Wie bereits in Abb. 8A gezeigt wurde, führte der Transfer einer geringen Anzahl von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen nicht zum Anstieg der ALT-Werte in TF-OVA Mäusen. Daher wurde nun untersucht, ob durch den Kotransfer mit Effektor CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Anzahl der zur Auslösung einer Hepatitis notwendigen CD8<sup>+</sup> T-Zellen herabgesetzt werden kann. Durch den Transfer von  $1 \times 10^6$  OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen allein wurde in TF-OVA Mäusen keine Hepatitis ausgelöst (ALT-Wert  $40,0 \pm 11,8$  U/L). Der Kotransfer mit Effektor OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen bewirkte dagegen einen signifikanten Anstieg der ALT-Werte auf  $149,4 \pm 42,1$  U/L. Das Ausmaß der Erkrankung wurde also verstärkt, wobei aber nicht die Dauer verlängert wurde, da die ALT-Werte zum Tag 15 wieder auf das Ausgangsniveau ( $38,3 \pm 3,2$  U/L) zurückgegangen waren.

Beim *in vivo* Zytolyse Assay (Abb. 22B) wiesen Effektor CD4<sup>+</sup> T-Zellen allein keine zytolytische Aktivität auf, verstärkten aber signifikant die Effektorfunktion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Leberlymphknoten, Leber und Milz. Die spezifische Lyse erhöhte sich durch den Kotransfer von Effektor OT-II CD4<sup>+</sup> mit OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den Leberlymphknoten von  $38,1 \pm 4,7\%$  auf  $82,3 \pm 5\%$ , in der Milz von  $35,8 \pm 5,5\%$  auf  $86,8 \pm 2,6\%$  sowie in der Leber von  $14,5 \pm 5,6\%$  auf  $75,6 \pm 3,1\%$  (jeweils CD8 allein vs. Kotransfer).

*In vitro* nach Th1 polarisierte Effektor OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen verstärkten somit die Effektorfunktion der OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen.





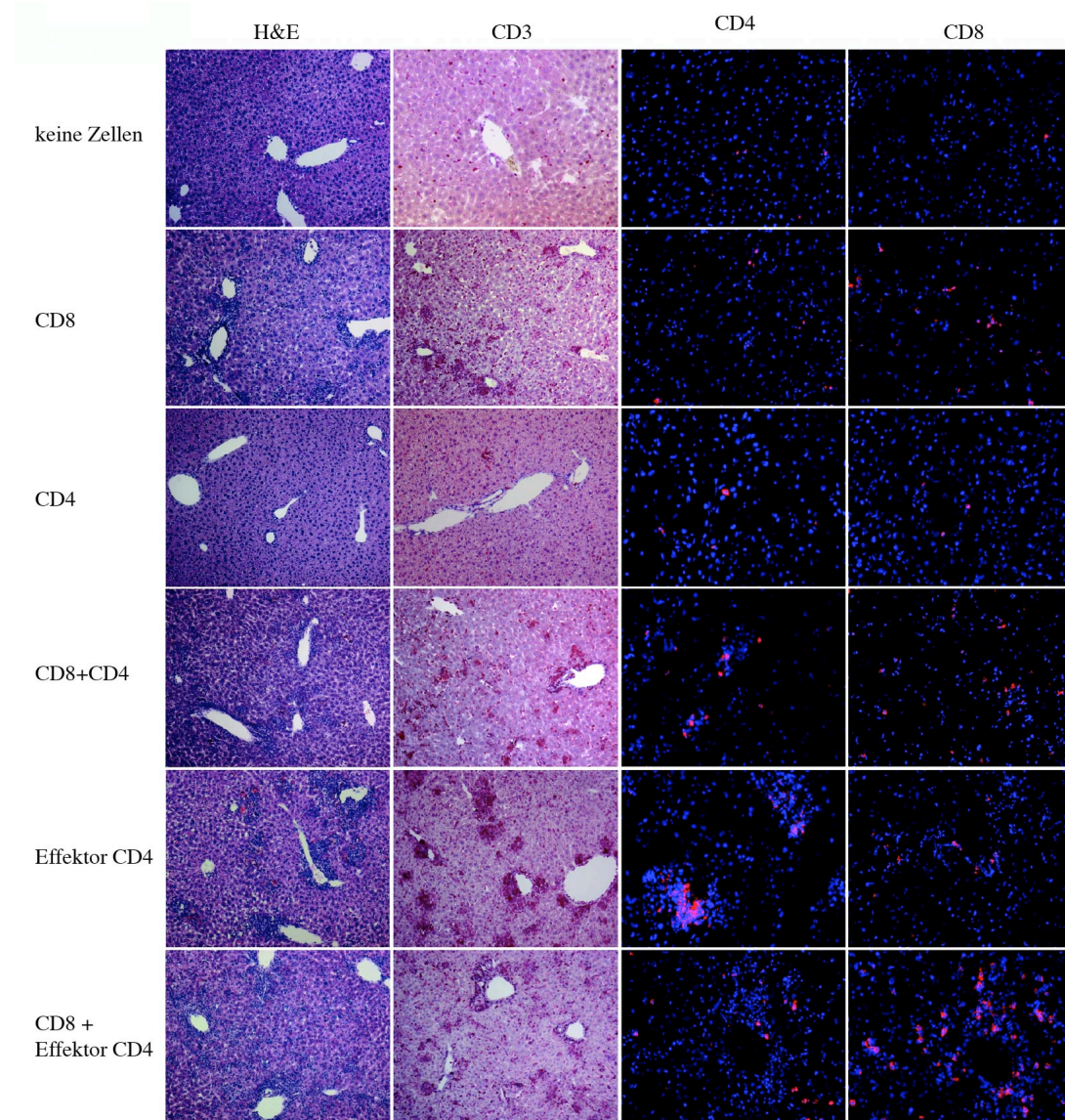
**Abb. 22: Effektor OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen verstärken die durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen induzierte Hepatitis.**

$4 \times 10^6$  Effektor OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden allein oder zusammen mit  $4 \times 10^6$  bzw.  $1 \times 10^6$  OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen *i.v.* in TF-OVA Mäusen transferriert. Als Kontrolle wurden  $4 \times 10^6$  und  $1 \times 10^6$  OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen allein injiziert. Als weitere Kontrolle wurden  $4 \times 10^6$  Effektor OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen allein oder zusammen mit  $4 \times 10^6$  OT-I CD8 T-Zellen *i.v.* in C57Bl/6 transferriert. Die ALT-Werte wurden fünf und 15 Tage nach Zelltransfer bestimmt. Es sind die absoluten Werte von  $n=6-8$ /Gruppe dargestellt (A).  $4 \times 10^6$  Effektor OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden allein (CD4) oder zusammen mit  $1 \times 10^6$  OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen (CD4+CD8) in TF-OVA Mäusen transferriert. Als Kontrolle wurden  $1 \times 10^6$  OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen (CD8) oder keine Zellen injiziert. Sechs Tage später wurde der *in vivo* Zytolyse Assay durchgeführt. Die Zellen wurden aus den Leberlymphknoten, der Milz und Leber isoliert, die CFSE<sup>+</sup> Zellen analysiert und die spezifische Lyse berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte der spezifische Lyse in %  $\pm$  SEM von  $n=6$ /Gruppe (B) (\*\* =  $p < 0,01$ ; ns = nicht signifikant, Mann-Whitney-Test).

#### 4.5 Histologische Charakterisierung des entzündlichen Infiltrats

Um das Infiltrat in TF-OVA Mäusen näher zu charakterisieren, wurden die Lebern unterschiedlicher Behandlungsgruppen sechs Tage nach dem Zelltransfer entnommen und mittels H&E-Färbung, immunhistochemischer Färbung für CD3 sowie Immunfluoreszenz für CD4 und CD8 untersucht (Abb. 23). Als portales und periportales Infiltrat wird ein zelluläres Infiltrat bezeichnet, das im Bereich der Portalfelder lokalisiert ist, während ein lobuläres Infiltrat sich im Parenchym der Leberläppchen befindet.

In der Leber unbehandelter TF-OVA Mäuse befanden sich keine Infiltrate und nur vereinzelte CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Nach dem Transfer von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen beobachtete man ein periportales und lobuläres Infiltrat, bei gleichzeitigem leichten Anstieg der CD4<sup>+</sup> Zellen. Im Gegensatz dazu führt der Transfer von OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht zu einem Infiltrat von CD3<sup>+</sup> bzw. CD4<sup>+</sup> Zellen in der Leber. Die Kombination von OT-II CD4<sup>+</sup> und OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen führte zu einem gemischten Infiltrat von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen in der Leber, wobei die CD8<sup>+</sup> Zellen dominierten. Transferierte man hingegen Effektor OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen allein, waren deutliche portale und periportale Anhäufungen von CD3<sup>+</sup> bzw. CD4<sup>+</sup> Zellen zu erkennen. Der Kotransfer von OT-I CD8<sup>+</sup> und Effektor OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen führte zu einem deutlichen Infiltrat mit erhöhter Anzahl von CD8<sup>+</sup> Zellen in den Lobuli sowie von CD4<sup>+</sup> Zellen im portalen und periportalen Bereich.



**Abb. 23: Histologische Charakterisierung des entzündlichen Infiltrats.**

Naive oder Effektor OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden allein oder zusammen mit OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen *i.v.* in TF-OVA Mäuse transferiert. Als Kontrolle wurden keine oder OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen allein injiziert. Sechs Tage später wurden die Lebern entfernt und für die histologische Analyse aufgearbeitet. Dargestellt sind repräsentative Bilder der Lebern mit H&E Färbung, CD3 immunohistochemischer sowie CD4 bzw. CD8 Immunfluoreszenz-Färbung von n=4-6/Gruppe mit der Vergrößerung x100 (H&E, CD3) und x200 (CD4, CD8).

## 5 Diskussion

### 5.1 Expression von Ovalbumin in Cholangiozyten und Hepatozyten

Mit Hilfe von RT-PCR, Western Blot und Immunhistochemie wurde zu Beginn der Arbeit die organ- und zellspezifische Expression von Ovalbumin in ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen nachgewiesen. In TF-OVA Mäusen wird Ovalbumin unter Kontrolle des Transferrinpromotors in den Hepatozyten und in ASBT-OVA Mäusen unter Kontrolle des Promotors für den apikalen Natrium-abhängigen Gallensalztransporter in den Cholangiozyten der größeren Gallengänge exprimiert.

Die Stärke der Expression eines Transgens ist abhängig von dem zufälligen Ort der Insertion und der Anzahl inserierter Kopien (Kong, et al., 2009; Matthaei, 2007). Aus diesen Gründen könnten Unterschiede in der Expressionstärke zwischen TF-OVA und ASBT-OVA Mäusen zum Teil die Ursache für die beobachteten unterschiedlichen Ergebnisse sein. Anhand des immunhistochemischen Nachweises konnte man jedoch sehr deutlich verschiedene Expressionsmuster zwischen beiden Stämmen erkennen.

Die Expression des ASBT erfolgt spezifisch in den Cholangiozyten der großen Gallengänge (Alpini, et al., 1997) und in den Enterozyten des terminalen Ileums (Dawson, et al., 2009). Zum Zeitpunkt der Konstruktion von ASBT-OVA gab es keine weiteren Tiermodelle, die ein Transgen unter dem ASBT-Promotor exprimieren. Inzwischen wurden Daten zu einem weiteren Modell veröffentlicht, bei dem ASBT zur Expression von Ovalbumin in Cholangiozyten verwendet wird (Buxbaum, et al., 2006).

Der Transferrin-Promotor wurde bereits hinsichtlich der für die gewebespezifische Expression verantwortlichen Promotorsequenzen charakterisiert. Die zur Konstruktion des Vektors verwendete -3kb Sequenz 5' des Transkriptionsstarts vom Transferrin-Gen wies die stärkste Expression in der Leber auf (Idzerda, et al., 1989). Dies ermöglicht die Produktion einer ausreichenden Menge an Antigen für die Kreuzpräsentation, da eine Mindestmenge an Antigen vorhanden sein muss, um effektiv kreuzpräsentiert zu werden (Heath and Carbone, 2001; Kurts, et al., 1998).

Die Expression von Transferrin beschränkt sich weitestgehend auf die Leber. Eine Expression konnte auch in Gehirn (Oligodendrozyten) (Sow, et al., 2006), Testis (Sertoli-Zellen) (Lecureuil, et al., 2004) und in geringen Mengen in Milz und Niere nachgewiesen werden (Idzerda, et al., 1986). In TF-OVA Mäusen wurde auf mRNA-Ebene ebenso eine geringe Expression von Ovalbumin im Testis nachgewiesen, aber nicht in der Milz oder der Niere. Die Expression im Gehirn wurde nicht untersucht. Da das Gehirn als „immunologisch privilegiertes“ Gewebe vor einer „normalen“ Immunantwort geschützt ist (Forrester, et al., 2008), kann eine eventuelle Expression im Gehirn vernachlässigt werden. Auf Proteinebene bestätigte sich die Expression von Ovalbumin jedoch nur in der Leber und nicht in den anderen Organen von ASBT-OVA und TF-OVA Mäusen.

Aufgrund der gewebespezifischen Expression können die beiden Stämme als Modelle zur Untersuchung der T-Zellantwort gegenüber einem in Hepatozyten oder Cholangiozyten exprimierten Antigen genutzt werden.

## 5.2 Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch hepatisches Antigen

Die ersten Tiermodelle zur Untersuchung der Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch hepatisches Antigen basierten auf der Expression eines allogenen MHC-I Moleküls in Hepatozyten (Met-K<sup>b</sup> und Alb-K<sup>b</sup>), welches von transgenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen (DES-TCR) erkannt wird (Bertolino, et al., 2001; Bertolino, et al., 1995; Limmer, et al., 1998). Das fremde Antigen wird jedoch nicht von professionellen APZ präsentiert. Unter physiologischen Bedingungen können APZ in der Leber abgestorbene Hepatozyten phagozytieren und deren Antigene im Kontext von MHC-II oder durch Kreuzpräsentation im Kontext von MHC-I präsentieren. Durch Dendritische Zellen, Kupffer Zellen, sinusoidale Leberendothelzellen und Ito-Zellen kann diese Präsentation in der Leber selbst erfolgen, durch Dendritische Zellen auch in den leberdrainierenden Lymphknoten. In den in dieser Arbeit beschriebenen Tiermodellen wird Ovalbumin in den Hepatozyten (TF-OVA) oder in den Cholangiozyten (ASBT-OVA) als Teil eines Membranmoleküls exprimiert. Das entspricht der physiologischen Situation, und das Protein kann wie ein zelluläres Protein prozessiert werden. Außerdem wird zellassoziertes Protein effizienter für CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert und führt zu besserer Kreuzpräsentation als lösliches Antigen (Li, et al., 2001).

Die Expression von Ovalbumin in Hepatozyten oder Cholangiozyten resultierte in einer unterschiedlichen Präsentation des Antigens, was sich in einem unterschiedlichen Migrations- und Aktivierungsmuster der transferierten antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen widerspiegelte. Das von Hepatozyten produzierte Antigen in TF-OVA Mäusen führte zur effizienten Retention, Proliferation und transienten Akkumulation antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber. Unabhängig von Milz und Lymphknoten entstanden leberschädigende Effektor CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Mit Hilfe von Knochenmarkchimären konnte gezeigt werden, dass knochenmarkabhängige APZ in der Leber und/oder den Lymphknoten und der Milz durch Kreuzpräsentation für die vollständigen Aktivierung und Differenzierung zu Effektorzellen essentiell sind.

Die Expression von Antigen durch Hepatozyten führte zu einem effizienten „trapping“ und einer Aktivierung antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber. Dies bestätigt die Ergebnisse anderer Gruppen (Bertolino, et al., 2001; John and Crispe, 2004) und beruht vermutlich auf der Interaktion des MHC-I/OVA<sub>257-264</sub> Komplexes auf den Hepatozyten mit dem TZR der transgenen T-Zellen sowie des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 der Hepatozyten mit LFA-1 der T-Zellen (Warren, et al., 2006). Der Effekt der antigenspezifischen Interaktion war so stark, dass 20h und 44h nach Zelltransfer praktisch keine Zellen aus den Lymphknoten in TF-OVA reisoliert werden konnten, obwohl das Antigen dort von Dendritischen Zellen kreuzpräsentiert wird (Sprengers, et al., 2008). Die transferierten Zellen wurden simultan aktiviert, was daran zu erkennen ist, dass die CFSE<sup>+</sup> Zellen sehr einheitlich und synchron in einem Proliferationspeak zusammen liegen. Ein geringer Anteil CFSE<sup>+</sup> transferierter T-Zellen migrierte auch in die Milz, und in einigen Versuchen wurden bereits zwei Tage nach Zelltransfer auch aus der Milz proliferierende Zellen isoliert. Es ist wahrscheinlich, dass diese Zellen

in der Leber aktivierte und anschließend umverteilte Zellen darstellen, da dieses Proliferationsmuster nicht in allen Versuchen beobachtet wurde und vom Zeitpunkt der Untersuchung abhängig war. In diesen Versuchen war es aber nicht möglich auszuschließen, dass auch in der Milz eine Aktivierung stattfindet. Der in den Tagen 1 bis 9 nach Zelltransfer beobachtete Anstieg der Anzahl von  $CD8^+V\alpha 2^+$  T-Zellen in Lymphknoten und Milz kommt also entweder durch Umverteilung der in der Leber aktivierten Zellen oder durch lokale Proliferation zustande. Auch im Modell von Wuensch *et al.* wurde nach einer primären Proliferation in der Leber eine Umverteilung der aktivierten antigenspezifischen  $CD8^+$  T-Zellen in Milz und Leberlymphknoten beschrieben (Wuensch, et al., 2006).

Da die verwendeten transgenen OT-I Spendertiere nicht auf einem Rag-defizienten Hintergrund gezüchtet wurden, könnte ein Teil der transferierten  $CD8^+$  T-Zellen über einen zweiten TZR durch Umweltantigene aktivierte Effektor/Gedächtniszellen darstellen. Aus diesem Grund wurden Kontrollversuche mit  $Rag1^{-/-}$  OT-I Zellen durchgeführt. Diesen Zellen fehlt das Enzym Rag1, welches zur somatischen Rekombination benötigt wird. Die gewonnenen Ergebnisse waren vergleichbar mit den zuvor erzielten und schließen aus, dass Effektor/Gedächtniszellen für die zuvor beschriebenen Ergebnisse verantwortlich sind.

Trotz der effizienten Retention der antigenspezifischen Zellen in den Lebern von TF-OVA Mäusen 20h nach dem Zelltransfer korrelierte die Anzahl der  $CD8^+V\alpha 2^+$  T-Zellen, die zu diesem Zeitpunkt wieder aus der Leber reisoliert werden können ( $0,19 \times 10^6$ ), nicht mit der Menge an  $CD8^+$  T-Zellen, welche transferiert wurden ( $4 \times 10^6$ ). Vermutlich wird die Anzahl der infiltrierenden Zellen aufgrund der Herunterregulation des TZR und des CD8 Moleküls nach der Aktivierung der T-Zellen und der kontinuierlichen Antigenexposition unterschätzt (Bertolino, et al., 1998; Ferber, et al., 1994; Huang, et al., 1994; Schonrich, et al., 1991; Schonrich, et al., 1992). Es kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, dass ein Großteil der transferierten Zellen durch Kontrollmechanismen vermindert wird.

Das von Cholangiozyten exprimierte Antigen in ASBT-OVA Mäusen führte zur präferentiellen Migration und Proliferation antigenspezifischer  $CD8^+$  T-Zellen in der Leber, aber auch zur Aktivierung in den drainierenden Lymphknoten. Im Gegensatz zu TF-OVA Mäusen entstehen jedoch Effektorzellen mit einem weniger stark ausgeprägten Phänotyp. Diese induzieren eine transiente Schädigung des biliären Epithels. Milz, Lymphknoten und knochenmarkabhängige APZ sind nicht für die Induktion der Proliferation in der Leber notwendig, letztere sind jedoch für Kreuzpräsentation in den Lymphknoten verantwortlich.

Die Expression von Ovalbumin in Cholangiozyten hatte einen weniger starken Effekt auf das „trapping“ der  $CD8^+$  T-Zellen. Die transferierten Zellen wiesen eine Präferenz für die Leber auf, verteilten sich aber auch in den anderen getesteten Organen. Hepatozyten sind für T-Zellen relativ leicht zugänglich, während die Interaktion von T-Zellen mit Gallenepithelien oder APZ, welche die Gallengänge patrouillieren, begrenzt zu sein scheint. Erst ein proinflammatorischer Stimulus verstärkt

die Immunantwort gegen Cholangiozyten und eine Interaktion von Immunzellen mit dem Gallengangepithel (Chen, et al., 2008).

In ASBT-OVA Mäusen erfolgte die Aktivierung antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber und den drainierenden Lymphknoten, sie wies aber eine andere Kinetik auf als in TF-OVA Mäusen. Hier konnten die verschiedenen Generationen sich teilender Zellen deutlich unterschieden werden. Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden in den Lymphknoten durch professionelle APZ aktiviert. Es ist aber unwahrscheinlich, dass die Aktivierung zuerst in den Lymphknoten und anschließend die Umverteilung der aktivierten Zellen in die Leber erfolgt, wie von Bowen *et al.* beschrieben (Bowen, et al., 2004), denn CFSE<sup>+</sup> Zellen im Leberlymphknoten und in den mesenterialen Lymphknoten von ASBT-OVA Mäusen proliferierten wesentlich langsamer als die aus der Leber isolierten Zellen.

Da die Antigenexpression und das Aktivierungsmuster in beiden Modellen sehr verschieden sind, konnte auch ein unterschiedliches Muster der die Leber infiltrierenden Zellen beobachtet werden. Das Entzündungsinfiltrat in der Leber von Patienten mit AIH besteht hauptsächlich aus Lymphozyten (Eggink, et al., 1982; Hashimoto, et al., 1993; Vergani, et al., 2009). Mittels H&E-Färbung sowie Immunfluoreszenz wurde nachgewiesen, dass in TF-OVA Mäusen die T-Zellen die Lobuli infiltrierten, während sich das Infiltrat in ASBT-OVA Mäusen auf die Portalfelder der größeren Gallengänge beschränkte. Das beobachtete Infiltrat entspricht dem histologischen Phänotyp bei AIH (Iwai, et al., 2008) bzw. PSC (Ponsioen, et al., 1999).

In den Modellen der Expression des allogenen MHC-I Moleküls erlangen die durch Hepatozyten aktivierten T-Zellen keine vollständige Effektorfunktion, sondern werden tolerant und gehen aufgrund fehlender Kostimulation, IL-2 Mangels und Induktion proapoptotischer Moleküle in Apoptose (Bertolino, et al., 1998; Bertolino, et al., 1999; Holz, et al., 2008). Um zu überprüfen, ob die in der Leber aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen in TF-OVA und ASBT-OVA Mäusen Effektorfunktion erlangen, wurde das Maß der Schädigung der Hepatozyten anhand der ALT-Werte gemessen sowie die Effektorfunktion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen überprüft. In Abhängigkeit von der Expression von Ovalbumin in den Hepatozyten oder Cholangiozyten zeigte sich auch eine differenzierte Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen und eine daraus resultierende Leberschädigung.

In ASBT-OVA sowie C57Bl/6 Mäusen war nach dem Transfer hoher Mengen antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen ein sehr geringer Anstieg der ALT-Werte zu verzeichnen. Dieser wurde vermutlich durch unspezifische Zytokinfreisetzung in Form einer sogenannten „Bystander Hepatitis“ verursacht und nicht durch direkte zytotoxische Effekte (Bowen, et al., 2002). In ASBT-OVA Mäusen wurde in einigen Versuchen auch das bei Erkrankungen der Gallenwege erhöhte Enzym Alkalische Phosphatase (AP) im Plasma gemessen. Es wurde aber kein Anstieg der AP beobachtet. Dies war eigentlich auch nicht zu erwarten, da der Entzündungsprozess nur transient ist und sich Anzeichen von Cholestase und somit Anstiege der AP-Werte in der Regel erst im chronischen Verlauf zeigen.

Der Transfer geringer Mengen antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen ( $0,25 \times 10^6$  bzw.  $1 \times 10^6$ ) in TF-OVA Mäuse führte nicht zur Induktion einer Schädigung der Leber, die anhand des ALT-Wertes im Plasma gemessen werden konnte. Erst der Transfer mittlerer ( $4 \times 10^6$ ) und relativ großer Mengen ( $8 \times 10^6$ ) naiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen induzierte eine transiente Schädigung des Parenchyms in TF-OVA Mäusen. Die Leberentzündung war spezifisch für TF-OVA Mäuse, denn in ASBT-OVA oder C57Bl/6 Mäusen war der ALT-Anstieg nicht zu verzeichnen.

Auch bei weiteren Überprüfungen der Effektorfunktion zeigte sich, dass die Aktivierung durch ein in der Leber exprimiertes Antigen auch beim Transfer von mittleren Zellzahlen ( $4 \times 10^6$ ) zur Generierung vollständig aktivierter CTL führt. Dabei wurde wiederum deutlich, dass das in Cholangiozyten exprimierte Ovalbumin zu einer geringeren Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen führte als das von den Hepatozyten exprimierte Antigen. Die Ursache könnte in der Toleranzinduktion durch inhibitorische oder fehlende kostimulatorische Signale der unaktivierten Cholangiozyten (Kamihira, et al., 2005; Leon, et al., 1995) sowie in der geringeren Expressionsmenge des Antigens liegen, wodurch es zur ineffizienten Kreuzpräsentation kommt (Kurts, et al., 1998).

Dennoch liegt auch diese zur Auslösung von Autoimmunität benötigte Anzahl antigenspezifischer Zellen nicht in einem physiologisch relevanten Bereich, hohe Zellzahlen sind jedoch in etlichen weiteren transgenen Modellen zur Induktion einer Immunpathologie ebenso notwendig (Buxbaum, et al., 2006; Buxbaum, et al., 2008; Heymann, et al., 2009; Wuensch, et al., 2006). Bezüglich der benötigten Zellzahl zeigt sich im Vergleich zu anderen Modellen Folgendes: i) Im Modell der Ovalbuminexpression in der Leber durch Transduktion eines Adeno-Virus-assoziierten Vektors von Wuensch *et al.* wird eine Effektorfunktion mit dem Transfer von  $5 \times 10^6$  antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen erzielt (Wuensch, et al., 2006). In diesem Modell wurde jedoch keine Messung der ALT-Werte durchgeführt. ii) Im RIP-mOVA-Modell, in dem membrangebundenes Ovalbumin u.a. von den Inselzellen des Pankreas exprimiert wird, führte der Transfer von  $5 \times 10^6$  antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei 100% der Versuchstiere zur Induktion von Diabetes. Der Transfer geringerer Zellzahlen ( $1 \times 10^6$ ) resultierte bei nur 50% der Tiere in Diabetes (Kurts, et al., 1997). Dabei ist im Vergleich zum TF-OVA Modell zu beachten, dass die in die Leber migrierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen in ein prinzipiell tolerogenes Umfeld gelangen und die Schwelle der Aktivierung somit höher liegen könnte.

Als Nachteil der ALT-Messung kann angeführt werden, dass kein absoluter Referenzbereich für Mausplasma festgelegt ist, ab dem der ALT-Wert als erhöht gilt. Bei der ALT-Messung ist außerdem keine qualitative Entscheidung möglich, da die Tiere individuelle Schwankungen des ALT-Wertes aufweisen. Auch kann der ALT-Wert insbesondere bei männlichen Tieren durch andere Einflüsse, wie z.B. emotionalen und sozialen Stress, ansteigen und dann nicht zwangsläufig auf eine immunologisch verursachte Hepatitis hinweisen (Sanchez, et al., 2002; Sanchez, et al., 2007). Entscheidende Vorteile hingegen liegen in der kontinuierlichen Überwachung individueller Tiere im zeitlichen Verlauf sowie in der quantitativen Aussage.

Da in einigen Versuchen in TF-OVA Mäusen auch Proliferation in der Milz nachgewiesen wurde und eine Aktivierung in den Lymphknoten und der Milz nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden Tiere splenektomiert und zusätzlich mit anti-CD62L Antikörper oder FTY720 behandelt. Die Aktivierung (Proliferation) und Effektorfunktion (ALT) transferierter OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde anschließend untersucht.

Die Applikation von neutralisierendem anti-CD62L Antikörper verhindert die L-selektin (CD62L) abhängige Adhäsion naiver T-Zellen an die peripheren Lymphknotenadressine (peripheral node addressins „PNAd“, wie z.B. GlyCam-1, CD34) an den Endothelzellen der „high endothelial venules“ (HEV) in den Lymphknoten. Diese Bindung vermittelt das Rollen der Leukozyten und leitet den ersten Schritt in der Adhäsionskaskade und Transmigration der T-Zellen ein. Dagegen verhindert FTY720 den Austritt von Lymphozyten aus dem Lymphknoten (Mandala, et al., 2002; Pinschewer, et al., 2000). FTY720 wird durch Sphingosin-Kinasen phosphoryliert (Billich, et al., 2003; Brinkmann, et al., 2002; Mandala, et al., 2002) und bewirkt als funktioneller Antagonist der Sphingosin-1-Phosphatrezeptoren (S1P<sub>1,3,4,5</sub>) eine Verminderung der S1P<sub>1</sub>-Rezeptoren auf T-Zellen (Brinkmann, et al., 2002; Mandala, et al., 2002). S1P-Rezeptoren reagieren auf den Sphingosingradienten in Blut und Lymphe und sind notwendig zum Austritt von Lymphozyten aus peripheren Lymphknoten und Thymus (Matloubian, et al., 2004). Durch Internalisierung der S1P-Rezeptoren reduziert sich vermutlich die Fähigkeit der T-Lymphozyten, auf Sphingosine im Blut zu reagieren. Dies führt zu einer Hemmung des Austritts aus Lymphknoten und Thymus (Mandala, et al., 2002; Mullershausen, et al., 2009; Pinschewer, et al., 2000).

Durch Splenektomie und Injektion von anti-CD62L Antikörper oder FTY720 konnte gezeigt werden, dass APZ in Milz und Lymphknoten nicht zur Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen notwendig sind und dass die Proliferation und Differenzierung in Effektorzellen bei beiden Stämmen in der Leber selbst erfolgen kann. Ein Teil dieser Ergebnisse wird durch die Daten von Sprengers *et al.* bestätigt (Sprengers, et al., 2008). Wahrscheinlich werden also die Zellen nicht in der Milz, sondern intrahepatisch aktiviert und verteilen sich danach um. Die gemessenen ALT-Werte in splenektomierten TF-OVA Mäusen stiegen sogar stärker an als in Kontrolltieren. Das deutet möglicherweise auf eine Rolle der Milz bei der Abschwächung der T-Zellaktivierung im TF-OVA Modell hin, etwa im Zusammenhang mit regulatorischen T-Zellen.

Die beschriebene Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen kann durch mehrere in der Leber vorhandene Zellpopulationen verursacht worden sein. Es wäre denkbar, dass die Effekte durch die Zielzellen in der Leber (Hepatozyten oder Cholangiozyten) oder durch APZ in der Leber ausgelöst werden. Mit den in dieser Arbeit verwendeten Modellen ASBT-OVA und TF-OVA war es nun möglich, genauer zu untersuchen, ob knochenmarkabhängige Zellen für die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen verantwortlich sind.



Dazu wurden TF-OVA und ASBT-OVA Knochenmarkchimären generiert, in denen die Präsentation bzw. Kreuzpräsentation des Antigens über MHC-I für CD8<sup>+</sup> T-Zellen nur durch nicht-knochenmarkabhängige Zellen, in der Leber also nur durch Hepatozyten oder Cholangiozyten bzw. LSEC und Ito-Zellen, erfolgen kann. Es besteht zwar die Möglichkeit, dass in der Leber vorhandene radioresistente Kupffer Zellen zur Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen beitragen können, aber diesen Zellen wird eine Beteiligung an inflammatorischen Reaktionen abgesprochen (Klein, et al., 2007).

Es konnte gezeigt werden, dass professionelle APZ nicht zur Induktion der Proliferation notwendig sind. Vermutlich werden die CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch auf Hepatozyten bzw. Cholangiozyten exprimiertes MHC-I/OVA<sub>257-264</sub> aktiviert, aber eine Kreuzpräsentation und Aktivierung durch LSEC oder Ito-Zellen kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Zur vollständigen Aktivierung naiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist neben der Interaktion von MHC-I/Antigen-Komplex mit dem TZR mindestens ein zweites kostimulatorisches Signal notwendig, welches über die Interaktion von CD80/86 mit CD28 vermittelt wird (Liu, et al., 1992). Hepatozyten und Cholangiozyten exprimieren keine kostimulatorischen Moleküle, jedoch kann PD-L1 auf Hepatozyten während der Aktivierungsphase auch die Funktion eines kostimulatorischen Moleküls übernehmen (Wahl, et al., 2008). Eine ähnliche Funktion wäre für PD-L1 auf Cholangiozyten möglich.

Professionelle APZ sind jedoch notwendig, um eine vollständige Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu erzielen. Das Potential der leberinfiltrierenden CD8<sup>+</sup>Vα2<sup>+</sup> Zellen zur IFN-γ Produktion nach antigenspezifischer und -unspezifischer Restimulation nach der Aktivierung in Knochenmarkchimären war signifikant vermindert, wenn auch nicht vollständig aufgehoben. Ebenso war, gemessen am ALT-Wert, die Fähigkeit, eine Hepatitis auszulösen, gehemmt. KC sind *in vitro* ineffiziente APZ (You, et al., 2008) und sind an der Toleranzinduktion in der Leber beteiligt (Breous, et al., 2009; Sun, et al., 2003; You, et al., 2008). Der Mechanismus der Kreuzpräsentation wurde auch für Makrophagen nachgewiesen (Burgdorf, et al., 2007; Kovacovics-Bankowski, et al., 1993; Pozzi, et al., 2005), aber im Speziellen für Kupffer Zellen nur *in vitro* nach Inkubation mit hoher Antigenkonzentration beschrieben (Limmer, et al., 2000). Es kann also angenommen werden, dass in TF-OVA MHC-II<sup>high</sup>CD11c<sup>high</sup> Dendritische Zellen an der Kreuzpräsentation und vollständigen Aktivierung der CD8<sup>+</sup> Zellen beteiligt, aber nicht allein für die Aktivierung der OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen verantwortlich sind (Plitas, et al., 2008).

Insgesamt demonstrieren diese Daten die transiente vollständige Aktivierung antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu zytotoxischen Effektorzellen in der Leber durch ein von Hepatozyten exprimiertes Antigen, wie sie auch von Wuensch *et al.* und Klein *et al.* gezeigt werden konnte (Klein and Crispe, 2006; Wuensch, et al., 2006). In diesen beiden Modellen ist Kreuzpräsentation des hepatischen Antigens durch APZ in der Leber möglich, es wurde jedoch nicht geklärt, welche Zellen in der Leber das Modellantigen präsentieren. Diese bereits beschriebenen Modelle haben folgende Nachteile: Durch die Infektion mit dem Adeno-Virus-assoziierten Vektor kann auch das angeborene

Immunsystem aktiviert werden und eine endogene Immunantwort gegen Ovalbumin vor dem T-Zell-Transfer erfolgen. Außerdem war die Frequenz der erfolgreich transduzierten und das Antigen exprimierenden Hepatozyten relativ gering (Wuensch, et al., 2006). Das von Klein *et al.* beschriebene Transplantationsmodell ist durch die Notwendigkeit einer Lebertransplantation bei der Maus schwierig durchzuführen. Es stellt ein Modell für den Einfluss eines Neoantigens bei der Toleranzinduktion, z.B. während akuter Infektion oder Transplantation, dar. Jedoch ist es kein Modell für den bei der autoimmunen Hepatitis beobachteten Toleranzverlust gegenüber einem Autoantigen, gegen das zuvor entweder zentral oder peripher Toleranz bestand (Klein and Crispe, 2006).

### 5.3 Regulation der durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen induzierten Hepatitis

Der Transfer antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in TF-OVA Mäuse führte zu einer Aktivierung und Proliferation der T-Zellen sowie zur Infiltration und Schädigung der Leber, die jedoch einen transienten Verlauf zeigte. Es wurde nachgewiesen, dass sich in der Leber im Verlauf der Hepatitis der Anteil aktiver Caspase 3<sup>+</sup> und TUNEL<sup>+</sup> Zellen im periportalen Infiltrat erhöhte. Des Weiteren stieg die Anzahl der CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Zellen in der Leber an. Die Depletion von Foxp3<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> Zellen in TF-OVAXDEREG Mäusen vor dem Transfer antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen resultierte in einer drastischen Verstärkung des CD8<sup>+</sup> T-Zell-Infiltrates und des Ausmaßes der Hepatitis. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass im TF-OVA Modell die durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen induzierte Hepatitis durch periphere Toleranzmechanismen, wie z.B. Deletion der aktivierten Zellen durch Apoptose und Induktion oder Expansion von Treg, kontrolliert wird und aus diesen Gründen einen transienten Verlauf aufweist. Regulatorische T-Zellen limitieren die Hepatitis, indem sie bereits zum Zeitpunkt der Aktivierung und Differenzierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine suppressive Funktion ausüben.

Eine der Aufgaben der Leber ist die Elimination aktivierter T-Zellen. Aktivierte Zellen werden selektiv in der Leber zurückbehalten und durch Apoptose deletiert (Huang, et al., 1994; Mehal, et al., 1999). Sowohl in TF-OVA als auch in ASBT-OVA Mäusen waren nach dem Transfer der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Verlauf von zwei Wochen nur transiente Effekte hinsichtlich Zellzahl, Infiltrat und Effektorfunktion zu beobachten. Da die Effektorfunktion in TF-OVA Mäusen deutlich stärker ausgeprägt war, wurde in diesem Stamm das Schicksal der OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen untersucht. Mittels TUNEL- und aktive Caspase 3-Färbung konnte ein Anstieg apoptotischer Zellen in der Leber nachgewiesen werden. Es gelang jedoch nicht, doppelt positive Zellen zu färben, die gleichzeitig sowohl CD8 exprimieren als auch TUNEL<sup>+</sup> oder Caspase 3<sup>+</sup> sind. Eine mögliche Ursache hierfür kann sein, dass die Expression des T-Zell-Rezeptors und des CD8 Moleküls in apoptotischen Zellen herunterreguliert wird (Bertolino, et al., 1998; Huang, et al., 1994). Auch in einem weiteren Versuch, die Apoptose mittels Durchflusszytometrie zu messen, war nur ein geringer Anteil an CD8<sup>+</sup>Vα2<sup>+</sup>/TUNEL<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup>Vα2<sup>+</sup>/Caspase 3<sup>+</sup> Zellen nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Die Induktion der Apoptose im TF-OVA Modell erfolgte entweder durch „death by neglect“ oder AICD (activation induced cell death). Beim „death by neglect“ wird in CD8<sup>+</sup> T-Zellen aufgrund fehlender kostimulatorischer Signale und unvollständiger Aktivierung Apoptose induziert (Bertolino, et al., 1999). Dagegen spricht, dass in TF-OVA Mäusen die transferierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu zytotoxischen Effektorzellen differenzieren. Alternativ könnten die aktivierten antigenspezifischen Zellen durch wiederholte Stimulation ihres TZR durch AICD deletiert werden (Mehal, et al., 1999).

Alternativ dazu ist es möglich, dass die Kontraktion der Immunantwort durch regulatorische T-Zellen gesteuert wird (de Lafaille and Lafaille, 2009; Sakaguchi, et al., 2008). Es finden sich Hinweise für eine verringerte Anzahl und fehlerhafte Funktion der Treg bei Patienten mit AIH (Longhi, et al., 2006; Longhi, et al., 2004; Longhi, et al., 2005). In diesen Studien wurden jedoch Treg im peripheren Blut untersucht. In der Leber wurde eine Erhöhung des Anteils von Foxp3<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollen beschrieben. Sie verteilen sich innerhalb der Entzündungsinfiltrate im Bereich der Portalfelder (Lan, et al., 2006). Die Funktionalität der Treg in der Leber von AIH-Patienten wurde jedoch in dieser Studie nicht analysiert.

Es wäre möglich, dass im TF-OVA Modell durch die Expression des Antigens im Thymus bereits für Ovalbumin spezifische nTreg vorhanden sind und expandieren oder dass nach dem Transfer der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Verlauf der Hepatitis iTreg in der Peripherie entstehen. Es wird diskutiert, dass die unvollständige Aktivierung und frühe Apoptose in den beschriebenen transgenen Modellen infolge der Induktion von Treg zustande kommt (Crispe, et al., 2006). Die konstitutive Expression des Transgens in der Leber und/oder in geringen Mengen im Thymus könnte zur Entwicklung regulatorischer T-Zellen beitragen. Eine Expression von Ovalbumin im Thymus von TF-OVA oder ASBT-OVA Mäusen konnte zwar auf mRNA- und Proteinebene nicht nachgewiesen werden, ist aber dennoch nicht auszuschließen.

Ein signifikanter Anteil der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die die Leber nach dem Transfer von CD8<sup>+</sup> T-Zellen infiltrieren, wies einen regulatorischen Phänotyp auf. Dies bestätigt die Daten von Bochtler *et al.* (Bochtler, et al., 2008) und entspricht den Ergebnissen, die im ConA-induzierten Hepatitis-Modell beschrieben wurden (Wei, et al., 2008). Der beobachtete Anstieg der Foxp3<sup>+</sup> Zellen in der Leber kann dabei durch Mobilisierung intrahepatischer Treg, Konversion konventioneller naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber oder durch Rekrutierung aus Lymphknoten, peripherem Blut oder Milz in die Leber zustande kommen. In der Leber könnten Treg mit Hilfe von Retinolsäure speichernden Ito-Zellen induziert werden (Winau, et al., 2008). Unter dem Einfluss von IFN- $\gamma$  können Ito-Zellen Antigen präsentieren und selektiv allogene CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg expandieren (Jiang, et al., 2008). Luth *et al.* konnten zeigen, dass die Expression eines Antigens in der Leber zur Konversion konventioneller CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu Foxp3<sup>+</sup> Treg führt. Dabei führt die Expression im Thymus und in der Leber nicht zur zentralen bzw. peripheren Deletion (Luth, et al., 2008).

Um den Einfluss der Treg auf den Verlauf der Hepatitis zu untersuchen, wurden TF-OVA Mäuse mit DEREK Mäusen gekreuzt (TF-OVAxDEREK) (Lahl, et al., 2007). Im Vergleich zur Depletion mit anti-CD25 Antikörper können so selektiv Foxp3<sup>+</sup> Zellen depletiert werden. Es ist technisch aber nicht möglich, Treg in diesem Modell dauerhaft zu depletieren und ihre Rolle im Verlauf einer chronischen Hepatitis zu untersuchen. Der geringe Anteil vorhandener nicht-transgener Foxp3<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> Zellen weitet sich nach der Depletion der Foxp3<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> Zellen aus und kann nicht mittels Diphtherie Toxin depletiert werden. Aus diesem Grund wurde der Ansatz gewählt, die Treg zum Zeitpunkt der Aktivierung der transferierten OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu depletieren. In diesen Versuchen konnte die bedeutende Rolle der Treg während der Expansion und Differenzierung der naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu zytotoxischen Effektorzellen nachgewiesen werden. Die Depletion der Treg vor dem Transfer antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen führte zu einer massiven Expansion der transferierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber und zur verstärkten Schädigung des Parenchyms, wie es auch im ConA-induzierten Hepatitis-Modell nach Depletion mit anti-CD25 Antikörper geschildert wurde (Wei, et al., 2008). Es ist möglich, dass die Hepatitis verstärkt wird, weil die OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen ungehindert proliferieren und sich dadurch die Anzahl der Effektorzellen erhöht oder weil die Effektorfunktion der OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen verstärkt wird. Von Chen *et al.* und Mempel *et al.* konnte die reversible Blockierung bereits differenzierter CTL durch Treg gezeigt werden (Chen, et al., 2005; Mempel, et al., 2006). Um diese Möglichkeit der Inhibierung im TF-OVA Modell zu überprüfen, könnte man in weiteren Versuchen die Treg zum Höhepunkt der Hepatitis, also etwa fünf Tage nach dem Zelltransfer, depletieren.

Es ist möglich, dass Treg in der Leber, den Lymphknoten oder an beiden Orten suppressive Funktion ausüben. Treg migrieren in die verschiedenen Organe und könnten dann entweder direkt mit den Effektorzellen interagieren oder indirekt über Dendritische Zellen die Immunantwort modulieren. Auch die Reihenfolge von Migration und Aktivierung der Treg könnte eine wichtige Rolle spielen (Zhang, et al., 2009).

Treg exprimieren den Chemokinrezeptor CXCR3 (Eksteen, et al., 2006). Der Ligand dafür ist CXCL10, ein durch IFN- $\gamma$  induziertes Chemokin. Nach der Behandlung mit der Substanz  $\alpha$ GalCer weisen besonders Hepatozyten, aber auch Kupffer Zellen und Cholangiozyten eine erhöhte CXCL10-Expression auf, und durch die Aktivierung der NKT-Zellen werden CXCR3<sup>+</sup> Treg in die Leber rekrutiert (Santodomingo-Garzon, et al., 2009). Es konnte außerdem in experimenteller „Graft versus Host Disease“ gezeigt werden, dass CXCR3<sup>+</sup> Treg auch in der Leber entzündungshemmend wirken (Hasegawa, et al., 2008). Bei Patienten mit AIH konnte eine erhöhte RNA-Expression von CXCL10 in Hepatozyten und ein erhöhter CXCL10-Gehalt im Serum nachgewiesen werden (Nishioji, et al., 2001). Es ist also möglich, dass Treg auch im TF-OVA Modell über die Interaktion von CXCL10 und CXCR3 in die Leber rekrutiert werden.

Von der bereits als immunsuppressives Medikament untersuchten Substanz FTY720 konnte u.a. gezeigt werden, dass sie die Aktivität von Treg verstärkt (Daniel, et al., 2007; Sawicka, et al., 2005) und die Migration von Effektorzellen aus den Lymphknoten an den Ort der Entzündung bzw. die

Migration von DC in die Lymphknoten verhindert (Lan, et al., 2008; Pinschewer, et al., 2000). Treg exprimieren geringere Mengen von S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>4</sub>-Rezeptoren und reagieren weniger stark auf S1P-Chemotaxis (Sawicka, et al., 2005). Die durch FTY720 verursachten Effekte sind den bei Verlust des S1P<sub>1</sub>-Rezeptors beobachteten Effekten ähnlich. S1P<sub>1</sub>-Defizienz in CD4<sup>+</sup> T-Zellen führt zu verstärkter Differenzierung von Treg im Thymus und erhöhter supprimierender Aktivität (Liu, et al., 2009). Eine solche Verstärkung der Aktivität der Treg und somit Verringerung der Hepatitis durch Injektion mit FTY720 wurde in TF-OVA Mäusen nicht beobachtet. In nicht in dieser Arbeit gezeigten Versuchen wurde die Anzahl der Foxp3<sup>+</sup> Zellen in der Leber nach Transfer von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen und Blockade der Migration der T-Zellen aus den Lymphknoten mit FTY720 in TF-OVA<sup>splen</sup> untersucht. Die Behandlung mit FTY720 führte zu einer verringerten Zahl von Foxp3<sup>+</sup> Zellen in der Leber im Vergleich zu nicht mit FTY720 behandelten Tieren. Die Zahl der Foxp3<sup>+</sup> Zellen in unbehandelten Lebern war allerdings noch niedriger. Das könnte darauf hindeuten, dass mindestens ein Teil der Foxp3<sup>+</sup> Zellen, die im Verlauf der Entzündung in der Leber gefunden wurden, aus der Milz oder den Lymphknoten in die Leber eingewandert sind. Alternativ könnten die Treg entweder in der Leber bei der Aktivierung durch Leber DC entstehen (Bamboot, et al., 2009) oder aus dem Blut rekrutiert werden.

Der Einfluss von Treg auf Dendritische Zellen ist über die Verminderung der kostimulatorischen Eigenschaften, der Reifung, der Antigenpräsentation oder der Migration der DC möglich (Onishi, et al., 2008; Shevach, 2009; Zhang, et al., 2009). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Kupffer Zellen, aber nicht LSEC oder Hepatozyten die Treg-Proliferation stimulieren (Wiegard, et al., 2005). Da im TF-OVA Modell Foxp3<sup>+</sup> Zellen in der Leber zum größten Teil innerhalb der CD3<sup>+</sup> Infiltrate zu finden sind, ist auch eine direkte Wirkung der Treg auf die CD3<sup>+</sup> Zellen denkbar. Treg könnten die Expansion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch Interaktion mit KC und Sekretion von IL-10 unterbinden (Breous, et al., 2009), durch IL-2-Verbrauch Apoptose induzieren (Shevach, 2009) oder direkt die Ausübung der Effektorfunktion der CTL inhibieren (Chen, et al., 2005; Mempel, et al., 2006).

#### **5.4 Aktivierung von OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen und Einfluss des hepatischen Antigens auf Effektor OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Über die intrahepatische Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder deren Rolle bei der Immunreaktion in der Leber *in vivo* ist relativ wenig bekannt. Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen setzt die Präsentation von Antigen auf APZ im Kontext mit MHC-II voraus.

Die meisten bisher gewonnenen Daten zur Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber beruhen jedoch auf *in vitro*-Experimenten. Dabei wird nicht die physiologische Situation der Prozedion und die differenzierte Präsentation von Antigen durch verschiedene Zellpopulationen repräsentiert. In den Modellen für AIH, in denen das allogene MHC-I Molekül exprimiert wurde, kann die Rolle der antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht untersucht werden. In dem von Wuensch *et al.* beschriebenen

Modell geht nicht deutlich hervor, ob von dem transduzierten Vektor das Ovalbumin-Protein mit dem Epitop für MHC-I und MHC-II exprimiert wird (Wuensch, et al., 2006). Ergebnisse zur Untersuchung der Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in diesem Modell liegen bisher nicht vor.

Die Expression von Ovalbumin in Cholangiozyten in ASBT-OVA Mäusen führte nicht zu einer Aktivierung von antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber oder in einem der anderen getesteten peripheren lymphoiden Organe. Im Gegensatz dazu resultierte die Expression von Ovalbumin in Hepatozyten in TF-OVA Mäusen in der Aktivierung von antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz und den Lymphknoten, jedoch selbst im entzündlichen Kontext nicht in der Leber selbst. Diese Aktivierung in der Milz induzierte keinen Th1-Phänotyp oder regulatorischen Phänotyp. Hingegen führte der Transfer von *in vitro* polarisierten Effektor OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur antigenunabhängigen Migration, aber antigenabhängigen Proliferation in der Leber von TF-OVA Mäusen.

Die Ergebnisse, die in den beiden in dieser Arbeit verwendeten Modellen ASBT-OVA und TF-OVA durch den Transfer antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen erzielt wurden, unterscheiden sich deutlich von den für die Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen beschriebenen Ergebnissen. Im Gegensatz zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen verteilten sich CD4<sup>+</sup> T-Zellen 20h nach dem Transfer sowohl in ASBT-OVA als auch in TF-OVA Mäusen in allen untersuchten Organen. Trotz der Expression des Antigenes in Hepatozyten oder Cholangiozyten und der Möglichkeit zur Präsentation über leberresidente APZ fand kein antigenspezifisches „trapping“ der CD4<sup>+</sup> T-Zellen statt. Im Gegenteil, es fanden sich in der Leber nach 20h kaum CFSE<sup>+</sup> Zellen wieder. Naive, unstimulierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen migrierten nur zu einem geringen Teil in die Leber bzw. wurden im Vergleich zu aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen weniger stark in der Leber retiniert (Hamann, et al., 2000; Klugewitz, et al., 2002).

In ASBT-OVA Mäusen konnte auch sieben Tage nach Zelltransfer keine Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass Antigen, das von Cholangiozyten unter nicht-inflammatorischen Bedingungen in der Leber exprimiert wird, keinen ausreichenden Zugang zu APZ in Leber oder Lymphknoten erhält, um naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu aktivieren. Diese Daten sind in Übereinstimmung mit den von Buxbaum *et al.* beschriebenen Ergebnissen nach dem Transfer von OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen im OVA-BIL Modell (Buxbaum, et al., 2006).

In TF-OVA Mäusen erfolgte im Gegensatz zu den CD8<sup>+</sup> T-Zellen keine Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber selbst, sondern durch professionelle APZ hauptsächlich in der Milz und den leberdrainierenden Lymphknoten. Dies deutet darauf hin, dass Antigen aus der Leber in Lymphknoten und Milz getragen wurde und dass die lokal vorhandene Menge an Antigen oder der Aktivierungsstatus der leberresidenten APZ die effiziente Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber ausschließt. Die Expression von MHC-II auf LSEC ist unter nicht-inflammatorischen Bedingungen also nicht ausreichend, um in TF-OVA Mäusen in einer antigenspezifischen Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu resultieren.

Luth *et al.* konnten nach dem Transfer MBP spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen in transgene Mäuse, welche MBP in Hepatozyten exprimieren, Proliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz und der Leber nachweisen (Luth, et al., 2008). Der Anteil proliferierender Zellen war jedoch nach sieben Tagen sehr gering, was auf eine ineffiziente Aktivierung schließen lässt. Da die Tiere nicht splenektomiert waren, kann man nicht ausschließen, dass die Aktivierung außerhalb der Leber stattfand. Die Unterschiede zum TF-OVA Modell könnten in unterschiedlicher Expressionsstärke des Antigens aufgrund verschiedener Promotoren oder in der unterschiedlichen Aufnahme und Prozessierung des Antigens durch die APZ liegen.

Drei Tage nach dem Transfer produzierte der Großteil der aus Milz und Leber von TF-OVA Mäusen reisolierten CFSE<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen nach Restimulation IL-2, aber wenige Zellen produzierten IFN- $\gamma$ , was die Induktion eines defekten Th1-Helferphänotyps anzeigt. Die in der Leber befindlichen CFSE<sup>+</sup> Zellen wurden nicht in der Leber selbst aktiviert, sondern sind aus der Milz umverteilte Zellen. Sie wiesen im Vergleich zur Milz eine verringerte IL-2 Produktion auf. Außerdem zeigten <1% der CFSE<sup>+</sup> Zellen in Leber und Milz eine Produktion von IL-10, -4, oder -17 (Daten nicht gezeigt). Nur ein geringer Anteil aus Leber oder Milz reisolierter Zellen (< 1%) wies einen regulatorischen Phänotyp auf. Man kann aber dennoch eine regulatorische Funktion der Zellen nicht ausschließen, da auch geringe Zellzahlen regulatorischer Zellen ausreichen können, um Effektorzellen zu supprimieren (Luth, et al., 2008).

In der Leber exprimieren DC, KC, LSEC und Ito-Zellen konstitutiv unterschiedliche Mengen von MHC-II Molekülen, Adhäsionsmolekülen und kostimulatorischen, aber auch inhibitorischen Molekülen (Diehl, et al., 2008; Kamihira, et al., 2005; Knolle and Limmer, 2003; Pillarisetty, et al., 2004; Wahl, et al., 2008; Winau, et al., 2007; You, et al., 2008; Yu, et al., 2004). Die Expression der meisten dieser Moleküle wird unter inflammatorischen Bedingungen verstärkt und kann dann auch auf Cholangiozyten und Hepatozyten induziert werden (Ayres, et al., 1993; Sacher, et al., 2002). In Hepatozyten wird bei chronischer aktiver Hepatitis die Expression von MHC-II Molekülen induziert (Chu and Liaw, 1993; Franco, et al., 1988; Toyonaga, et al., 1994). *In vitro*-Daten konnten zeigen, dass MHC-II-exprimierende Hepatozyten (Herkel, et al., 2003) oder Leber APZ (Wiegard, et al., 2005) in der Lage sind, CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu aktivieren, wenn auch mit der Induktion eines defizienten Helferphänotyps (Wiegard, et al., 2007). Dieser Mechanismus ist aber nicht an der CD4 T-Zellaktivierung im TF-OVA Modell einer akuten Hepatitis beteiligt. Obgleich die Rekrutierung der CFSE<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen in die Leber durch die vorausgehende Induktion einer Hepatitis verstärkt wurde, konnte die Antigenpräsentation nicht ausreichend erhöht und das Proliferationsmuster naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen nur unwesentlich beeinflusst werden. Vermutlich ist die verstärkte Migration antigenunspezifisch und beruht auf der erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen durch Hepatozyten oder LSEC (Sacher, et al., 2002; Shetty, et al., 2008), welche die Interaktion der in den Sinusoiden passierenden Lymphozyten mit hepatischen Zellpopulationen verlängert. Es ist ebenfalls

möglich, dass eine verstärkte Migration durch die veränderte Expression von Chemokinen bzw. deren Rezeptoren in der Leber hervorgerufen wird (Schrage, et al., 2008). Dies ist aber offensichtlich nicht ausreichend, um zu einer Aktivierung der naiven  $CD4^+$  T-Zellen in der Leber von TF-OVA zu führen.

Wie gezeigt wurde, migrierten naive  $CD4^+$  T-Zellen auch in Anwesenheit von Antigenen nur zu einem geringen Teil in die Leber. Im Gegensatz dazu wiesen aktivierte  $CD4^+$  T-Zellen eine Präferenz für die Leber auf. Im Stadium der Entzündung erlaubt dies eventuell die Rekrutierung weiterer Effektorzellen (Hamann, et al., 2000; Klugewitz, et al., 2002). Dabei erfolgte eine effektivere Rekrutierung *in vitro* polarisierter Th1-Zellen in die Leber im Vergleich zu *in vitro* polarisierten Th2-Zellen. Dieser Prozess ist nicht LFA-1, ICAM-1 oder P- oder E-Selektin abhängig, sondern könnte über die Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren geregelt werden (Klugewitz, et al., 2002; Schrage, et al., 2008). Im Vergleich zu aktivierten  $CD8^+$  T-Zellen werden die aktivierten  $CD4^+$  T-Zellen jedoch weniger stark in der Leber zurückgehalten (Mehal, et al., 1999). In TF-OVA Mäusen konnte die präferentielle Migration von *in vitro* Th1 polarisierten  $CD4^+$  Effektorzellen in die Leber bestätigt werden. Dies ist jedoch nicht antigenabhängig, da diese Effektorzellen im gleichen Ausmaß auch in die Leber von C57Bl/6 Mäusen migrieren. Aber nur in TF-OVA und nicht in C57Bl/6 Mäusen proliferieren die Effektorzellen dort auch. Ob die Antigenerkennung dabei zuerst über MHC-II<sup>+</sup> Zellen in der Leber, der Milz, den mesenterialen oder den Leberlymphknoten erfolgt, kann aus diesem Versuch nicht geschlossen werden. Wahrscheinlich geschieht die Antigenerkennung in der Leber, da sich dort bereits nach 20h fast alle transferierten Zellen befinden.

### **5.5 Die Auswirkung des Kotransfers von OT-II $CD4^+$ T-Zellen und Effektor OT-II $CD4^+$ T-Zellen mit OT-I $CD8^+$ T-Zellen**

Die Ergebnisse bezüglich der  $CD4^+$  T-Zellen weisen insgesamt darauf hin, dass die Rolle der  $CD4^+$  T-Zellen eher in der Reaktion auf eine Leberentzündung beruht, als dass sie an der Verursachung einer solchen beteiligt sind. Während die Anwesenheit von OT-II  $CD4^+$  T-Zellen durch den gleichzeitigen Transfer mit OT-I  $CD8^+$  T-Zellen nur zu einer geringen Verstärkung der Hepatitis in TF-OVA Mäusen führte, resultierte der Kotransfer von *in vitro* polarisierten Effektor OT-II  $CD4^+$  T-Zellen zusammen mit OT-I  $CD8^+$  T-Zellen in einer deutlichen Zunahme der Effektorfunktion von OT-I  $CD8^+$  T-Zellen. Jedoch wurde weder durch den gleichzeitigen noch den versetzten Transfer von OT-I  $CD8^+$  T-Zellen mit naiven bzw. Effektor OT-II  $CD4^+$  T-Zellen die Dauer der Hepatitis verlängert, und der Verlauf der Hepatitis blieb transient. Daraus kann man schließen, dass die fehlende Hilfe durch antigenspezifische  $CD4^+$  T-Zellen nicht verantwortlich für den transienten Verlauf der Hepatitis ist. Die Rolle antigenspezifischer  $CD4^+$  T-Zellen bei der Ausbildung von  $CD8^+$  Gedächtniszellen wurde bislang nicht untersucht.



Der Transfer naiver OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen in TF-OVA Mäuse führte, gemessen am ALT-Wert, nicht zur Induktion einer Hepatitis und hatte keinen Einfluss auf die Stärke und Dauer der durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen ausgelösten Immunpathologie. Obwohl drei Tage nach dem Transfer in der Leber CD4<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> Zellen detektiert wurden, war nach sechs Tagen histologisch kein CD4<sup>+</sup> T-Zell-Infiltrat in der Leber nachweisbar. Auch in anderen Modellen, in denen ein transgenes Autoantigen exprimiert wird, führt der alleinige Transfer einer hohen Zahl antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht zu deren Aktivierung und zur Auslösung von Autoimmunität (Buxbaum, et al., 2006; Buxbaum, et al., 2008; Heymann, et al., 2009; Kurts, et al., 1997).

Jedoch kann im RIP-mOVA Modell durch die Bereitstellung von Hilfe durch antigenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen die transferierte Menge von CD8<sup>+</sup> Zellen, die zur Auslösung von Autoimmunität nötig ist, deutlich verringert werden (Kurts, et al., 1997). Die ineffiziente Hilfe naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur Verstärkung der Aktivität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber von TF-OVA Mäusen kann nicht die verschiedenen Migrationseigenschaften und Orte der Aktivierung der beiden Zelltypen als Ursache haben, da auch der zeitversetzte Transfer, der die gleichzeitige Anwesenheit beider Zelltypen in der Leber sicherstellt, keine Steigerung der ALT-Werte bewirkte. CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen können durch die Interaktion von CD40L mit CD40 auf APZ die Antigenpräsentation verstärken oder über Zytokinsekretion (z.B. IL-2) sowie direkte Interaktionen mit CD40 auf den CD8<sup>+</sup> T-Zellen die Aktivierung und das Überleben der CD8<sup>+</sup> T-Zellen fördern (Behrens, et al., 2004; Bevan, 2004). Obwohl in TF-OVA Mäusen aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen große Mengen IL-2 produzierten, war dies nicht ausreichend zur Verstärkung der CD8 Effektorfunktion. Die signifikante, wenn auch geringe Erhöhung der zytolytischen Aktivität beim Kotransfer antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen könnte möglicherweise aus der sich anschließenden Aktivierung von NK-Zellen in der Leber resultieren, welche ebenfalls zytolytisch aktiv sein können (Chavez-Galan, et al., 2009). Außerdem ist es möglich, dass der *in vivo* Zytolyse Assay sensitiver ist als die ALT-Messung und daher geringe Änderungen der Effektorfunktion eher nachweisbar sind.

Im OVA-HEP Modell wurden nach dem Kotransfer antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen andere Ergebnisse als im TF-OVA Modell beobachtet. Im OVA-HEP Modell wurde ein früherer, aber geringerer ALT-Anstieg beschrieben. Die Unterschiede könnten wiederum auf der Verwendung eines anderen Promotors (Albumin-Promotor) und damit auf verminderter Expressionsstärke beruhen (Buxbaum, et al., 2008).

Der Transfer von OT-II CD4<sup>+</sup> Effektorzellen allein führte trotz der hohen IFN- $\gamma$  Produktion und starken Infiltration der TF-OVA-Leber, gemessen am ALT-Wert, nicht zur Induktion einer Hepatitis. Dies könnte durch die Regulation der IFN- $\gamma$  Produktion nach dem Transfer *in vivo* bedingt sein (Blumenthal-Barby, et al., 2006). Auch in anderen Modellen wurde gezeigt, dass der alleinige Transfer von *in vitro* aktivierten antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen keine nachweisbaren Auswirkungen hat (Heymann, et al., 2009). Jedoch wird durch den Kotransfer von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit *in vitro* aktivierten antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine organspezifische Immunpathologie ausgelöst

(Behrens, et al., 2004; Heymann, et al., 2009) oder endogene autoreaktive CD8<sup>+</sup> T-Zellen werden nach dem Transfer von *in vitro* aktivierten antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen aktiviert und expandieren (Calzascia, et al., 2008). In Übereinstimmung mit den von Behrens *et al.* beschriebenen Ergebnissen war beim Kotransfer von OT-II CD4<sup>+</sup> Effektorzellen mit OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in TF-OVA Mäuse eine geringere Anzahl von CD8<sup>+</sup> T-Zellen ( $1 \times 10^6$ ) ausreichend, um eine Hepatitis zu induzieren. Es ist dabei möglich, dass die voraktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Hilfe zur Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen über die Lizenzierung von Dendritischen Zellen leisten (Behrens, et al., 2004; Calzascia, et al., 2008) oder dass die Zytokinproduktion durch Effektor CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber die verstärkte Effektorfunktion der OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen bewirkte. Ebenso ist es denkbar, dass die Proliferation der OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen verstärkt wird und die dadurch erhöhte Anzahl der CD8<sup>+</sup> Effektorzellen die Zytotoxizität auslöst.

Mit ASBT-OVA Mäusen wurden weitere, in dieser Arbeit nicht gezeigte Versuche durchgeführt, um den Beitrag antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu untersuchen. Jedoch führte auch der Transfer *in vitro* polarisierter CD4<sup>+</sup> Effektorzellen nicht zur weiteren Aktivierung dieser Zellen durch ein von Cholangiozyten exprimiertes Antigen. Ebenso konnte durch den Transfer naiver oder polarisierter CD4<sup>+</sup> Effektor T-Zellen sowie durch den Kotransfer von Effektor CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen keine Induktion oder Verstärkung der Leberschädigung im Sinne eines ALT-Anstiegs festgestellt werden. Die Ergebnisse bezüglich des Kotransfers von antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen unterscheiden sich von den von Buxbaum *et al.* dargestellten Daten in dem ASBT-OVA ähnlichen Modell OVA-BIL (Buxbaum, et al., 2006). In diesem Modell wird Ovalbumin ebenso unter der Kontrolle des ASBT-Promotors in Cholangiozyten exprimiert. Jedoch wurden nach dem Kotransfer eine wesentlich stärkere Leberschädigung und Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen beschrieben als im ASBT-OVA Modell. Die Unterschiede könnten auf erhöhter Expression des Autoantigens, der Verwendung nicht aufgereinigter Splenozyten, der hohen Zellzahl der transferierten Zellen ( $10 \times 10^6$  OT-I zusammen mit  $4 \times 10^6$  OT-II) oder der Applikationsart (i.p.) beruhen.

## 5.6 Histologische Charakterisierung des Infiltrats

Patienten mit AIH weisen ein gemischtes Infiltrat inflammatorischer Zellen in der Leber auf, das von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen dominiert wird. Zunächst wurde vermutet, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen die hauptsächliche gewebeschädigende Effektorpopulation in der Leber darstellen (Lohr, et al., 1994; Robinson, et al., 2009; Schlaak, et al., 1993; Senaldi, et al., 1992). In den letzten Jahren ist aber klar geworden, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine dominante Rolle insbesondere zu Beginn der Krankheit spielen (Ichiki, et al., 2005; Suzuki, et al., 2004). Die immunhistochemische Färbung der Leberbiopsien von AIH-Patienten zeigen, dass sich CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Portalfeld der entzündeten Lebern befinden, während CD8<sup>+</sup> T-Zellen periportal und im Parenchym lokalisiert sind (De Biasio, et al., 2006; Eggink, et al., 1982; Hashimoto, et al., 1993; Vergani, et al., 2009). Das lässt vermuten, dass die direkte

Schädigung der Leber durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen ausgelöst wird. Die histologischen Daten in TF-OVA Mäusen bestätigen dies. CD4<sup>+</sup> T-Zellen lokalisieren sich hauptsächlich im Portalfeld und periportal, während CD8<sup>+</sup> T-Zellen periportal zu finden sind und auch unabhängig vom Kotransfer mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Lobuli infiltrieren.

### 5.7 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Expression von Ovalbumin in der Leber resultierte in der intrahepatischen Aktivierung adoptiv transferierter antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die Kreuzpräsentation des Antigens durch knochenmarkabhängige APZ führte zur Differenzierung in zytotoxische T-Zellen mit voller Effektorfunktion. Die Kontrolle der Entzündungsaktivität erfolgte u.a. durch Treg. Die Expression von Ovalbumin in der Leber führte dagegen nicht zur intrahepatischen Aktivierung adoptiv transferierter antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Das hepatische Antigen wurde von knochenmarkabhängigen APZ in der Milz und den Lymphknoten präsentiert und resultierte in der Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit unvollständiger Effektorfunktion. Naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen leisteten nur eine geringe Hilfe für CD8<sup>+</sup> T-Zellen und differenzierten nicht zu CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen.

Die Modelle TF-OVA und ASBT-OVA repräsentieren nicht die chronische Eigenschaft humaner autoimmuner Hepatitis bzw. Cholangitis. Sie basieren auf dem adoptiven Transfer von T-Zellen, sind nicht selbsterhaltend, und die Rolle von B-Zellen sowie die Entstehung von Autoantikörpern werden nicht berücksichtigt. Sie ermöglichen jedoch grundlegende Untersuchungen zum besseren Verständnis der Rolle verschiedener T-Zellpopulationen in der Pathogenese autoimmuner Lebererkrankungen sowie zur Antigenpräsentation und Aktivierung von T-Zellen durch hepatisches Antigen.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse bestätigen die entscheidende Rolle von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Pathogenese immunvermittelter Leberschädigung. Mit den  $\beta 2m^{-/-} \rightarrow$ TF-OVA und  $\beta 2m^{-/-} \rightarrow$ ASBT-OVA Chimären wurde jedoch nicht eindeutig geklärt, welcher knochenmarkabhängige Zelltyp in der Leber letztendlich zur Kreuzpräsentation und Aktivierung der OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen führt. Die selektive Depletion von Kupffer Zellen und Dendritischen Zellen im TF-OVA Modell wird weiterführende Untersuchungen zur Rolle der einzelnen Zellpopulationen der Leber bei der intrahepatischen T-Zellaktivierung *in vivo* ermöglichen. Dazu stehen folgende Werkzeuge zur Verfügung: Die *i.v.* Injektion von Clodronat-Liposomen resultiert in einer systemischen Depletion von Makrophagen (Vanrooijen, et al., 1990), also auch von Kupffer Zellen in der Leber. Die Applikation von Diphtherie Toxin in TF-OVAxCD11cDTR Mäusen ermöglichte die Depletion von CD11c<sup>high</sup>MHC-II<sup>high</sup> Dendritischen Zellen (Jung, et al., 2002). Durch eine anschließende Analyse der Effektorfunktion von adoptiv transferierten OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen kann die Auswirkung der Antigenpräsentation durch einzelne Zellpopulationen in den mit Clodronat-Liposomen oder DT-behandelten Mäusen untersucht werden. Des Weiteren kann durch *in vitro*-Versuche geklärt werden, welche Zellen aus der Leber von TF-OVA und ASBT-OVA Mäusen dazu in der Lage sind,

Ovalbumin zu präsentieren bzw. zu kreuzpräsentieren. Durch selektive Isolierung und Kultivierung von Hepatozyten, Cholangiozyten, Leberendothelzellen, Ito-Zellen, Kupffer Zellen und Dendritischen Zellen kann diese Fragestellung beantwortet werden.

CD4<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen sind zur Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz und Immunhomeostase unentbehrlich (Sakaguchi, et al., 2008). Im Einklang damit wird auch in TF-OVA Mäusen das Ausmaß der durch die antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen induzierten Hepatitis durch CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg kontrolliert. Der Mechanismus der Suppression ist aber im TF-OVA Modell noch nicht geklärt. Erste Versuche schließen eine Wirkung der Treg auf die Induktion von Apoptose in den expandierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus und deuten auf eine Bedeutung der PD-1/PD-L1-Interaktion hin. Weitere Untersuchungen sind zum besseren Verständnis und für die detaillierte Analyse des suppressiven Mechanismus der Treg im TF-OVA Modell notwendig.

Die Beteiligung von Th17-Zellen bei murinen experimentellen und humanen Autoimmunerkrankungen erlangte in der letzten Zeit immer größere Bedeutung (Bettelli, et al., 2008). Auch in den Lebern von Patienten mit viraler Hepatitis oder autoimmunen Lebererkrankungen wurde ein erhöhter Anteil von Th17<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen (Lan, et al., 2009; Lemmers, et al., 2009; Zhang, et al., 2009). Zur genauen Rolle von Th17-Zellen bei AIH und PSC sowie in den dafür bekannten Mausmodellen ist bisher wenig beschrieben. In weiteren Versuchen können die antigenabhängigen Migrations- und Effektorfunktionen von *in vitro* mit Th17-Eigenschaften versehenen Effektorzellen in Abhängigkeit von der Antigenexpression durch Hepatozyten oder Cholangiozyten untersucht werden.

Das ASBT-OVA Modell ermöglicht außerdem weitere Analysen zum Verständnis des enterohepatischen Kreislaufs (Grant, et al., 2002). Durch Kreuzung von ASBT-OVA Mäusen mit IFABP-OVA Mäusen, die Ovalbumin in den Enterozyten des Dünndarms exprimieren, kann die wechselseitige antigenabhängige und -unabhängige Migration und Aktivierung von T-Zellen untersucht werden.

## 6 Literatur

- Alam, S. M.; Travers, P. J.; Wung, J. L.; Nasholds, W.; Redpath, S.; Jameson, S. C. and Gascoigne, N. R. J. (1996): T-cell-receptor affinity and thymocyte positive selection, *Nature* 381 [6583], pp. 616-620.
- Allina, J.; Hu, B.; Sullivan, D. M.; Fiel, M. I.; Thung, S. N.; Bronk, S. F.; Huebert, R. C.; van de Water, J.; LaRusso, N. F.; Gershwin, M. E.; Gores, G. J. and Odin, J. A. (2006): T cell targeting and phagocytosis of apoptotic biliary epithelial cells in primary biliary cirrhosis, *Journal of Autoimmunity* 27 [4], pp. 232-241.
- Alpini, G.; Glaser, S. S.; Rodgers, R.; Phinizy, J. L.; Robertson, W. E.; Lasater, J.; Caligiuri, A.; Tretjak, Z. and LeSage, G. D. (1997): Functional expression of the apical Na<sup>+</sup>-dependent bile acid transporter in large but not small rat cholangiocytes, *Gastroenterology* 113 [5], pp. 1734-40.
- Amsen, D.; Blander, J. M.; Lee, G. R.; Tanigaki, K.; Honjo, T. and Flavell, R. A. (2004): Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells, *Cell* 117 [4], pp. 515-26.
- Ando, K.; Guidotti, L. G.; Cerny, A.; Ishikawa, T. and Chisari, F. V. (1994): Ctl Access to Tissue Antigen Is Restricted in-Vivo, *Journal of Immunology* 153 [2], pp. 482-488.
- Andre, I.; Gonzalez, A.; Wang, B.; Katz, J.; Benoist, C. and Mathis, D. (1996): Checkpoints in the progression of autoimmune disease: Lessons from diabetes models, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 [6], pp. 2260-2263.
- Aron, J. H. and Bowlus, C. L. (2009): The immunobiology of primary sclerosing cholangitis, *Seminars in Immunopathology* 31 [3], pp. 383-397.
- Ayres, R. C. S.; Neuberger, J. M.; Shaw, J.; Joplin, R. and Adams, D. H. (1993): Intercellular-Adhesion Molecule-1 and MHC Antigens on Human Intrahepatic Bile-Duct cells - Effect of Proinflammatory Cytokines, *Gut* 34 [9], pp. 1245-1249.
- Bamboot, Z. M.; Stableford, J. A.; Plitas, G.; Burt, B. M.; Nguyen, H. M.; Welles, A. P.; Gonen, M.; Young, J. W. and DeMatteo, R. P. (2009): Human Liver Dendritic Cells Promote T Cell Hyporesponsiveness, *Journal of Immunology* 182 [4], pp. 1901-1911.
- Barnden, M. J.; Allison, J.; Heath, W. R. and Carbone, F. R. (1998): Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements, *Immunol Cell Biol* 76 [1], pp. 34-40.
- Behrens, G. M. N.; Li, M.; Davey, G. M.; Allison, J.; Flavell, R. A.; Carbone, F. R. and Heath, W. R. (2004): Helper requirements for generation of effector CTL to islet beta cell antigens, *Journal of Immunology* 172 [9], pp. 5420-5426.
- Belz, G. T.; Behrens, G. M. N.; Smith, C. M.; Miller, J.; Jones, C.; Lejon, K.; Fathman, C. G.; Mueller, S. N.; Shortman, K.; Carbone, F. R. and Heath, W. R. (2002): The CD8 alpha(+) dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens, *Journal of Experimental Medicine* 196 [8], pp. 1099-1104.
- Benichou, G.; Takizawa, P. A.; Olson, C. A.; McMillan, M. and Sercarz, E. E. (1992): Donor Major Histocompatibility Complex (Mhc) Peptides Are Presented by Recipient Mhc Molecules During Graft-Rejection, *Journal of Experimental Medicine* 175 [1], pp. 305-308.
- Berg, M.; Wingender, G.; Djandji, D.; Hegenbarth, S.; Momburg, F.; Hammerling, G.; Limmer, A. and Knolle, P. (2006): Cross-presentation of antigens from apoptotic tumor cells by liver sinusoidal

- endothelial cells leads to tumor-specific CD8(+) T cell tolerance, *European Journal of Immunology* 36 [11], pp. 2960-2970.
- Bertolino, P.; Bowen, D. G.; McCaughan, G. W. and Fazekas de St Groth, B. (2001): Antigen-specific primary activation of CD8+ T cells within the liver, *J Immunol* 166 [9], pp. 5430-8.
- Bertolino, P.; Heath, W. R.; Hardy, C. L.; Morahan, G. and Miller, J. F. (1995): Peripheral deletion of autoreactive CD8+ T cells in transgenic mice expressing H-2Kb in the liver, *Eur J Immunol* 25 [7], pp. 1932-42.
- Bertolino, P.; McCaughan, G. W. and Bowen, D. G. (2002): Role of primary intrahepatic T-cell activation in the 'liver tolerance effect', *Immunol Cell Biol* 80 [1], pp. 84-92.
- Bertolino, P.; Schrage, A.; Bowen, D. G.; Klugewitz, K.; Ghani, S.; Eulenburg, K.; Holz, L.; Hogg, N.; McCaughan, G. W. and Hamann, A. (2005): Early intrahepatic antigen-specific retention of naive CD8+ T cells is predominantly ICAM-1/LFA-1 dependent in mice, *Hepatology* 42 [5], pp. 1063-71.
- Bertolino, P.; Trescol-Biemont, M. C. and Rabourdin-Combe, C. (1998): Hepatocytes induce functional activation of naive CD8+ T lymphocytes but fail to promote survival, *Eur J Immunol* 28 [1], pp. 221-36.
- Bertolino, P.; Trescol-Biemont, M. C.; Thomas, J.; Fazekas de St Groth, B.; Pihlgren, M.; Marvel, J. and Rabourdin-Combe, C. (1999): Death by neglect as a deletional mechanism of peripheral tolerance, *Int Immunol* 11 [8], pp. 1225-38.
- Bettelli, E.; Korn, T.; Oukka, M. and Kuchroo, V. K. (2008): Induction and effector functions of T(H)17 cells, *Nature* 453 [7198], pp. 1051-1057.
- Bevan, M. J. (2004): Helping the CD8(+) T-cell response, *Nature Reviews Immunology* 4 [8], pp. 595-602.
- Billich, A.; Bornancin, F.; Devay, P.; Mechtcheriakova, D.; Urtz, N. and Baumruker, T. (2003): Phosphorylation of the Immunomodulatory Drug FTY720 by Sphingosine Kinases, *J. Biol. Chem.* 278 [48], pp. 47408-47415.
- Blumenthal-Barby, F.; Hamann, A. and Klugewitz, K. (2006): Adoptively transferred Th1 cell populations lose IFN[gamma]+ cells by cytokine down-regulation on single-cell level, *Immunology Letters* 107 [2], pp. 176-181.
- Bochtler, P.; Riedl, P.; Gomez, I.; Schirmbeck, R. and Reimann, J. (2008): Local Accumulation and Activation of Regulatory Foxp3(+) CD4 T-R Cells Accompanies the Appearance of Activated CD8 T Cells in the Liver, *Hepatology* 48 [6], pp. 1954-1963.
- Bowen, D. G.; Warren, A.; Davis, T.; Hoffmann, M. W.; McCaughan, G. W.; Fazekas de St Groth, B. and Bertolino, P. (2002): Cytokine-dependent bystander hepatitis due to intrahepatic murine CD8 T-cell activation by bone marrow-derived cells, *Gastroenterology* 123 [4], pp. 1252-64.
- Bowen, D. G.; Zen, M.; Holz, L.; Davis, T.; McCaughan, G. W. and Bertolino, P. (2004): The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity, *J Clin Invest* 114 [5], pp. 701-12.
- Breous, E.; Somanathan, S.; Vandenberghe, L. H. and Wilson, J. M. (2009): Hepatic Regulatory T Cells and Kupffer Cells Are Crucial Mediators of Systemic T Cell Tolerance to Antigens Targeting Murine Liver, *Hepatology* 50 [2], pp. 612-621.
- Brigl, M. and Brenner, M. B. (2004): CD1: Antigen presentation and T cell function, *Annual Review of Immunology* 22, pp. 817-890.

- Brinkmann, V.; Davis, M. D.; Heise, C. E.; Albert, R.; Cottens, S.; Hof, R.t; Bruns, C.; Prieschl, E.; Baumruker, T.; Hiestand, P.; Foster, C. A.; Zollinger, M. and Lynch, K. R. (2002): The Immune Modulator FTY720 Targets Sphingosine 1-Phosphate Receptors, *J. Biol. Chem.* 277 [24], pp. 21453-21457.
- Broome, U.; Grunewald, J.; Scheynius, A.; Olerup, O. and Hultcrantz, R. (1997): Preferential V beta3 usage by hepatic T lymphocytes in patients with primary sclerosing cholangitis, *J Hepatol* 26 [3], pp. 527-34.
- Brown, G. D. (2006): Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor, *Nature Reviews Immunology* 6 [1], pp. 33-43.
- Burgdorf, S.; Kautz, A.; Bohnert, V.; Knolle, P. A. and Kurts, C. (2007): Distinct Pathways of Antigen Uptake and Intracellular Routing in CD4 and CD8 T Cell Activation, *Science* 316 [5824], pp. 612-616.
- Burgdorf, S. and Kurts, C. (2008): Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation, *Current Opinion in Immunology* 20 [1], pp. 89-95.
- Buxbaum, J.; Qian, P.; Khuu, C.; Shneider, B. L.; Daikh, D. I.; Gershwin, M. E.; Allen, P. M. and Peters, M. G. (2006): Novel model of antigen-specific induction of bile duct injury, *Gastroenterology* 131 [6], pp. 1899-906.
- Buxbaum, J.; Qian, P. Q.; Allen, P. M. and Peters, M. G. (2008): Hepatitis resulting from liver-specific expression and recognition of self-antigen, *Journal of Autoimmunity* 31 [3], pp. 208-215.
- Calzascia, T.; Pellegrini, M.; Lin, A.; Garza, K. M.; Elford, A. R.; Shahinian, A.; Ohashi, P. S. and Mak, T. W. (2008): CD4 T cells, lymphopenia, and IL-7 in a multistep pathway to autoimmunity, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 [8], pp. 2999-3004.
- Chavez-Galan, L.; Arenas-Del, A. M. C.; Zenteno, E.; Chavez, R. and Lascurain, R. (2009): Cell Death Mechanisms Induced by Cytotoxic Lymphocytes, *Cellular & Molecular Immunology* 6 [1], pp. 15-25.
- Chen, F.; Ma, L.; Al-Ansari, N. and Shneider, B. (2001): The role of AP-1 in the transcriptional regulation of the rat apical sodium-dependent bile acid transporter, *J Biol Chem* 276 [42], pp. 38703-14.
- Chen, F.; Ma, L.; Dawson, P. A.; Sinal, C. J.; Sehayek, E.; Gonzalez, F. J.; Breslow, J.; Ananthanarayanan, M. and Shneider, B. L. (2003): Liver receptor homologue-1 mediates species- and cell line-specific bile acid-dependent negative feedback regulation of the apical sodium-dependent bile acid transporter, *J Biol Chem* 278 [22], pp. 19909-16.
- Chen, M. L.; Pittet, M. J.; Gorelik, L.; Flavell, R. A.; Weissleder, R.; von Boehmer, H. and Khazaie, K. (2005): Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 [2], pp. 419-24.
- Chen, W. J.; Jin, W. W.; Hardegen, N.; Lei, K. J.; Li, L.; Marinos, N.; McGrady, G. and Wahl, S. M. (2003): Conversion of peripheral CD4(+)CD25(-) naive T cells to CD4(+)CD25(+) regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3, *Journal of Experimental Medicine* 198 [12], pp. 1875-1886.
- Chen, X. M.; O'Hara, S. P. and LaRusso, N. F. (2008): The immunobiology of cholangiocytes, *Immunology and Cell Biology* 86 [6], pp. 497-505.

- Christen, U.; Hintermann, E. and Jaeckel, E. (2009): New Animal Models for Autoimmune Hepatitis, *Seminars in Liver Disease* 29 [3], pp. 262-272.
- Chu, C. M. and Liaw, Y. F. (1993): Coexpression of intercellular-adhesion molecule-1 and class-I major histocompatibility complex antigens on hepatocyte membrane in chronic viral-hepatitis, *Journal of Clinical Pathology* 46 [11], pp. 1004-1008.
- Constant, S. L. and Bottomly, K. (1997): Induction of TH1 and TH2 CD4+ T cell responses: The alternative approaches, *Annual Review of Immunology* 15, pp. 297-322.
- Coombes, J. L.; Siddiqui, K. R.R.; Arancibia-Carcamo, C. V.; Hall, J. A.; Sun, C.-M.; Belkaid, Y. and Powrie, F. (2007): A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF- $\beta$  and retinoic acid dependent mechanism, *J. Exp. Med.* 204 [8], pp. 1757-1764.
- Crispe, I. N.; Giannandrea, M.; Klein, I.; John, B.; Sampson, B. and Wuensch, S. (2006): Cellular and molecular mechanisms of liver tolerance, *Immunological Reviews* 213, pp. 101-118.
- Croft, M.; Duncan, D. D. and Swain, S. L. (1992): Response of Naive Antigen-Specific Cd4+ T-Cells In vitro - Characteristics and Antigen-Presenting Cell Requirements, *Journal of Experimental Medicine* 176 [5], pp. 1431-1437.
- Czaja, A. J. and Donaldson, P. T. (2002): Gender effects and Synergisms with histocompatibility leukocyte antigens in type 1 autoimmune hepatitis, *American Journal of Gastroenterology* 97 [8], pp. 2051-2057.
- Daniel, C.; Sartory, N.; Zahn, N.; Geisslinger, G.; Radeke, H. H. and Stein, J. M. (2007): FTY720 Ameliorates Th1-Mediated Colitis in Mice by Directly Affecting the Functional Activity of CD4+CD25+ Regulatory T Cells, *J Immunol* 178 [4], pp. 2458-2468.
- Dawson, P. A.; Lan, T. and Rao, A. (2009): Bile acid transporters, *J. Lipid Res.*, pp. R900012-JLR200.
- De Biasio, M. B.; Periolo, N.; Avagnina, A.; de Davila, M. T. G.; Ciocca, M.; Goni, J.; de Matteo, E.; Galoppo, C.; Canero-Velasco, M. C.; Fainboim, H.; Munoz, A. E.; Fainboim, L. and Chernavsky, A. C. (2006): Liver infiltrating mononuclear cells in children with type 1 autoimmune hepatitis, *Journal of Clinical Pathology* 59 [4], pp. 417-423.
- de Jong, E. C.; Smits, H. H. and Kapsenberg, M. L. (2005): Dendritic cell-mediated T cell polarization, *Springer Seminars in Immunopathology* 26 [3], pp. 289-307.
- de Lafaille, M. A. C. and Lafaille, J. J. (2009): Natural and Adaptive Foxp3(+) Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor?, *Immunity* 30 [5], pp. 626-635.
- Decock, S.; McGee, P. and Hirschfield, G. M. (2009): Autoimmune liver disease for the non-specialist, *British Medical Journal* 339.
- Diehl, L.; Schurich, A.; Grochtmann, R.; Hegenbarth, S.; Chen, L. and Knolle, P. A. (2008): Tolerogenic maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7-homolog 1-dependent CD8(+) T cell tolerance, *Hepatology* 47 [1], pp. 296-305.
- Djilali-Saiah, I.; Lapierre, P.; Vitozzi, S. and Alvarez, F. (2002): DNA vaccination breaks liver tolerance for a neo-self-antigen: A transgenic murine model of autoimmune hepatitis, *Tissue Antigens* 59, pp. 89-89.



- Eberl, G.; Lees, R.; Smiley, S. T.; Taniguchi, M.; Grusby, M. J. and MacDonald, H. R. (1999): Tissue-specific segregation of CD1d-dependent and CD1d-independent NK T cells, *Journal of Immunology* 162 [11], pp. 6410-6419.
- Eggink, H. F.; Houthoff, H. J.; Huitema, S.; Gips, C. H. and Poppema, S. (1982): Cellular and Humoral Immune-Reactions in Chronic Active Liver-Disease .1. Lymphocyte Subsets in Liver Biopsies of Patients with untreated Idiopathic Autoimmune Hepatitis, Chronic Active Hepatitis-B and Primary Biliary-Cirrhosis, *Clinical and Experimental Immunology* 50 [1], pp. 17-24.
- Eipel, C.; Hirschmann, M.; Abshagen, K.; Menger, M. D. and Vollmar, B. (2007): Local interaction of apoptotic hepatocytes and Kupffer cells in a rat model of systemic endotoxemia, *Hepatology Research* 37 [10], pp. 863-871.
- Eksteen, B.; Grant, A. J.; Miles, A.; Curbishley, S. M.; Lalor, P. F.; Hubscher, S. G.; Briskin, M.; Salmon, M. and Adams, D. H. (2004): Hepatic endothelial CCL25 mediates the recruitment of CCR9+ gut-homing lymphocytes to the liver in primary sclerosing cholangitis, *J Exp Med* 200 [11], pp. 1511-7.
- Eksteen, B.; Miles, A.; Curbishley, S. M.; Tselepis, C.; Grant, A. J.; Walker, L. S. K. and Adams, D. H. (2006): Epithelial inflammation is associated with CCL28 production and the recruitment of regulatory T cells expressing CCR10, *Journal of Immunology* 177 [1], pp. 593-603.
- Erhardt, A.; Biburger, M.; Papadopoulos, T. and Tiegs, G. (2007): IL-10, regulatory T cells, and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver injury in mice, *Hepatology* 45 [2], pp. 475-485.
- Falasca, L.; Bergamini, A.; Serafino, A.; Balabaud, C. and Dini, L. (1996): Human Kupffer Cell Recognition and Phagocytosis of Apoptotic Peripheral Blood Lymphocytes, *Experimental Cell Research* 224 [1], pp. 152-162.
- Fava, G.; Glaser, S.; Francis, H. and Alpini, G. (2005): The immunophysiology of biliary epithelium, *Seminars in Liver Disease* 25 [3], pp. 251-264.
- Ferber, I.; Schonrich, G.; Schenkel, J.; Mellor, A. L.; Hammerling, G. J. and Arnold, B. (1994): Levels of peripheral T cell tolerance induced by different doses of tolerogen, *Science* 263 [5147], pp. 674-6.
- Fickert, P.; Fuchsbichler, A.; Wagner, M.; Zollner, G.; Kaser, A.; Tilg, H.; Krause, R.; Lammert, F.; Langner, C.; Zatloukal, K.; Marschall, H. U.; Denk, H. and Trauner, M. (2004): Regurgitation of bile acids from leaky sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) bile ducts causes knockout mice, *Gastroenterology* 127 [1], pp. 261-274.
- Fontenot, J. D.; Gavin, M. A. and Rudensky, A. Y. (2003): Foxp3 programs the development and function of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells, *Nature Immunology* 4 [4], pp. 330-336.
- Forrester, J. V.; Xu, H.; Lambe, T. and Cornall, R. (2008): Immune privilege or privileged immunity?, *Mucosal Immunol* 1 [5], pp. 372-81.
- Franco, A.; Barnaba, V.; Natali, P.; Balsano, C.; Musca, A. and Balsano, F. (1988): Expression of Class-I and Class-II Major Histocompatibility Complex Antigens on Human Hepatocytes, *Hepatology* 8 [3], pp. 449-454.
- Fujita, T.; Inoue, K.; Yamamoto, S.; Ikumoto, T.; Sasaki, S.; Toyama, R.; Chiba, K.; Hoshino, Y. and Okumoto, T. (1994): Fungal Metabolites .11. A Potent Immunosuppressive Activity Found In Isaria-Sinclairii Metabolite, *Journal of Antibiotics* 47 [2], pp. 208-215.

- Giannandrea, M.; Pierce, R. H. and Crispe, I. N. (2009): Indirect Action of Tumor Necrosis Factor-Alpha in Liver Injury During the CD8+T Cell Response to an Adeno-Associated Virus Vector in Mice, *Hepatology* 49 [6], pp. 2010-2020.
- Goodnow, C. C. (1996): Balancing immunity and tolerance: Deleting and tuning lymphocyte repertoires, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 [6], pp. 2264-2271.
- Grant, A. J.; Lalor, P. F.; Hubscher, S. G.; Briskin, M. and Adams, D. H. (2001): MAdCAM-1 expressed in chronic inflammatory liver disease supports mucosal lymphocyte adhesion to hepatic endothelium (MAdCAM-1 in chronic inflammatory liver disease), *Hepatology* 33 [5], pp. 1065-72.
- Grant, A. J.; Lalor, P. F.; Salmi, M.; Jalkanen, S. and Adams, D. H. (2002): Homing of mucosal lymphocytes to the liver in the pathogenesis of hepatic complications of inflammatory bowel disease, *Lancet* 359 [9301], pp. 150-157.
- Groux, H.; O'Garra, A.; Bigler, M.; Rouleau, M.; Antonenko, S.; de Vries, J. E. and Roncarolo, M. G. (1997): A CD4+T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis, *Nature* 389 [6652], pp. 737-742.
- Hamann, A.; Klugewitz, K.; Austrup, F. and Jablonski-Westrich, D. (2000): Activation induces rapid and profound alterations in the trafficking of T cells, *Eur J Immunol* 30 [11], pp. 3207-18.
- Hasegawa, H.; Inoue, A.; Kohno, M.; Lei, J.; Miyazaki, T.; Yoshie, O.; Nose, M. and Yasukawa, M. (2008): Therapeutic effect of CXCR3-expressing regulatory T cells on liver, lung and intestinal damages in a murine acute GVHD model, *Gene Ther* 15 [3], pp. 171-82.
- Hashimoto, E.; Lindor, K. D.; Homburger, H. A.; Dickson, E. R.; Czaja, A. J.; Wiesner, R. H. and Ludwig, J. (1993): Immunohistochemical characterization of hepatic lymphocytes in primary biliary-cirrhosis in comparison with primary sclerosing cholangitis and autoimmune chronic active hepatitis, *Mayo Clinic Proceedings* 68 [11], pp. 1049-1055.
- Hawiger, D.; Inaba, K.; Dorsett, Y.; Guo, M.; Mahnke, K.; Rivera, M.; Ravetch, J. V.; Steinman, R. M. and Nussenzweig, M. C. (2001): Dendritic Cells Induce Peripheral T Cell Unresponsiveness Under Steady State Conditions In Vivo, *J. Exp. Med.* 194 [6], pp. 769-780.
- Heath, W. R. and Carbone, F. R. (2001): Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity, *Annu Rev Immunol* 19, pp. 47-64.
- Herkel, J.; Jagemann, B.; Wiegand, C.; Lazaro, J. F.; Lueth, S.; Kanzler, S.; Blessing, M.; Schmitt, E. and Lohse, A. W. (2003): MHC class II-expressing hepatocytes function as antigen-presenting cells and activate specific CD4 T lymphocytes, *Hepatology* 37 [5], pp. 1079-85.
- Heymann, F.; Meyer-Schwesinger, C.; Hamilton-Williams, E. E.; Hammerich, L.; Panzer, U.; Kaden, S.; Quaggin, S. E.; Floege, J.; Grone, H. J. and Kurts, C. (2009): Kidney dendritic cell activation is required for progression of renal disease in a mouse model of glomerular injury, *Journal of Clinical Investigation* 119 [5], pp. 1286-1297.
- Hirakata, Y.; Tomono, K.; Tateda, K.; Matsumoto, T.; Furuya, N.; Shimoguchi, K.; Kaku, M. and Yamaguchi, K. (1991): Role of bacterial association with Kupffer cells in occurrence of endogenous systemic bacteremia, *Infection and Immunity* 59 [1], pp. 289-294.
- Hoebe, K.; Janssen, E. and Beutler, B. (2004): The interface between innate and adaptive immunity, *Nature Immunology* 5 [10], pp. 971-974.
- Hogquist, K. A.; Jameson, S. C.; Heath, W. R.; Howard, J. L.; Bevan, M. J. and Carbone, F. R. (1994): T-Cell Receptor Antagonist Peptides Induce Positive Selection, *Cell* 76 [1], pp. 17-27.

- Holdener, M.; Hintermann, E.; Bayer, M.; Rhode, A.; Rodrigo, E.; Hintereder, G.; Johnson, E. F.; Gonzalez, F. J.; Pfeilschifter, J.; Manns, M. P.; Herrath, M. V. and Christen, U. (2008): Breaking tolerance to the natural human liver autoantigen cytochrome P450 2D6 by virus infection, *Journal of Experimental Medicine* 205 [6], pp. 1409-1422.
- Holz, L. E.; Benseler, V.; Bowen, D. G.; Bouillet, P.; Strasser, A.; O'Reilly, L.; D'Avigdor, W. M. H.; Bishop, A. G.; McCaughan, G. W. and Bertolino, P. (2008): Intrahepatic murine CD8 T-Cell activation associates with a distinct phenotype leading to Bim-dependent death, *Gastroenterology* 135 [3], pp. 989-997.
- Hori, S.; Nomura, T. and Sakaguchi, S. (2003): Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3, *Science* 299 [5609], pp. 1057-61.
- Horton, R.; Wilming, L.; Rand, V.; Lovering, R. C.; Bruford, E. A.; Khodiyar, V. K.; Lush, M. J.; Povey, S.; Talbot, C. C.; Wrigth, M. W.; Wain, H. M.; Trowsdale, J.; Ziegler, A. and Beck, S. (2004): Gene map of the extended human MHC, *Nature Reviews Genetics* 5 [12], pp. 889-899.
- Hoshino, Y.; Enomoto, N.; Izumi, N.; Kurosaki, M.; Marumo, F. and Sato, C. (1995): Limited usage of T-cell receptor beta chains and sequences of the complementarity determining region 3 of lymphocytes infiltrating in the liver of autoimmune hepatitis, *Hepatology* 22 [1], pp. 142-7.
- Huang, L.; Soldevila, G.; Leeker, M.; Flavell, R. and Crispe, I. N. (1994): The liver eliminates T-cells undergoing antigen-triggered apoptosis in-vivo, *Immunity* 1 [9], pp. 741-749.
- Ichiki, Y.; Aoki, C. A.; Bowlus, C. L.; Shimoda, S.; Ishibashi, H. and Gershwin, M. E. (2005): T cell immunity in autoimmune hepatitis, *Autoimmunity Reviews* 4 [5], pp. 315-321.
- Idzerda, R. L.; Behringer, R. R.; Theisen, M.; Huggenvik, J. I.; McKnight, G. S. and Brinster, R. L. (1989): Expression from the transferrin gene promoter in transgenic mice, *Mol Cell Biol* 9 [11], pp. 5154-62.
- Idzerda, R. L.; Huebers, H.; Finch, C. A. and McKnight, G. S. (1986): Rat transferrin gene-expression - Tissue specific regulation by iron-deficiency, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 [11], pp. 3723-3727.
- Ishibashi, H.; Nakamura, M.; A., Komori, M., Migita and Shimoda, S. (2009): Liver architecture, cell function, and disease, *Seminars in Immunopathology*.
- Itano, A. A. and Jenkins, M. K. (2003): Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node, *Nature Immunology* 4 [8], pp. 733-739.
- Itoh, M.; Takahashi, T.; Sakaguchi, N.; Kuniyasu, Y.; Shimizu, J.; Otsuka, F. and Sakaguchi, S. (1999): Thymus and Autoimmunity: Production of CD25+CD4+ Naturally Anergic and Suppressive T Cells as a Key Function of the Thymus in Maintaining Immunologic Self-Tolerance, *J Immunol* 162 [9], pp. 5317-5326.
- Iwai, M.; Jo, M.; Ishii, M.; Mori, T. and Harada, Y. (2008): Comparison of clinical features and liver histology in acute and chronic autoimmune hepatitis, *Hepatology Research* 38 [8], pp. 784-789.
- Jameson, S. C. (2002): Maintaining the norm: T-CELL homeostasis, *Nature Reviews Immunology* 2 [8], pp. 547-556.
- Janeway, C. A. (1992): The T-Cell Receptor as a Multicomponent Signaling Machine - Cd4/Cd8 Coreceptors and Cd45 in T-Cell Activation, *Annual Review of Immunology* 10, pp. 645-674.

- Jenkins, MK; Chen, CA; Jung, G; Mueller, DL and Schwartz, RH (1990): Inhibition of antigen-specific proliferation of type 1 murine T cell clones after stimulation with immobilized anti-CD3 monoclonal antibody, *J Immunol* 144 [1], pp. 16-22.
- Jiang, G.; Yang, H. R.; Wang, L.; Wildey, G. M.; Fung, J.; Qian, S. and Lu, L. (2008): Hepatic stellate cells preferentially expand allogeneic CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in an IL-2-dependent manner, *Transplantation* 86 [11], pp. 1492-502.
- John, B. and Crispe, I. N. (2004): Passive and active mechanisms trap activated CD8<sup>+</sup> T cells in the liver, *J Immunol* 172 [9], pp. 5222-9.
- Jomantaite, L.; Dikopoulos, N.; Kroger, A.; Leithauser, F.; Hauser, H.; Schirmbeck, R. and Reimann, J. (2004): Hepatic dendritic cell subsets in the mouse, *European Journal of Immunology* 34 [2], pp. 355-365.
- Jung, S.; Unutmaz, D.; Wong, P.; Sano, G. I.; De los Santos, K.; Sparwasser, T.; Wu, S. J.; Vuthoori, S.; Ko, K.; Zavala, F.; Pamer, E. G.; Littman, D. R. and Lang, R. A. (2002): In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens, *Immunity* 17 [2], pp. 211-220.
- Jungermann, K. (1995): Zonation of metabolism and gene expression in liver, *Histochemistry and Cell Biology* 103 [2], pp. 81-91.
- Kamihira, T.; Shimoda, S.; Nakamura, M.; Yokoyama, T.; Takii, Y.; Kaivano, A.; Handa, M.; Ishibashi, H.; Gershwin, M. E. and Harada, M. (2005): Biliary epithelial cells regulate autoreactive T cells: Implications for biliary-specific diseases, *Hepatology* 41 [1], pp. 151-159.
- Kapsenberg, M. L. (2003): Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization, *Nature Reviews Immunology* 3 [12], pp. 984-993.
- Katz, S. C.; Pillarisetty, V. G.; Bleier, J. I.; Shah, A. B. and DeMatteo, R. P. (2004): Liver sinusoidal endothelial cells are insufficient to activate T cells, *Journal of Immunology* 173 [1], pp. 230-235.
- Kita, H.; Matsumura, S.; He, X. S.; Ansari, A. A.; Lian, Z. X.; Van de Water, J.; Coppel, R. L.; Kaplan, M. M. and Gershwin, M. E. (2002): Quantitative and functional analysis of PDC-E2-specific autoreactive cytotoxic T lymphocytes in primary biliary cirrhosis, *Journal of Clinical Investigation* 109 [9], pp. 1231-1240.
- Klein, I.; Cornejo, J. C.; Polakos, N. K.; John, B.; Wuensch, S. A.; Topham, D. J.; Pierce, R. H. and Crispe, I. N. (2007): Kupffer cell heterogeneity: functional properties of bone marrow-derived and sessile hepatic macrophages, *Blood* 110 [12], pp. 4077-4085.
- Klein, I. and Crispe, I. N. (2006): Complete differentiation of CD8<sup>+</sup> T cells activated locally within the transplanted liver, *J Exp Med* 203 [2], pp. 437-47.
- Klugewitz, K.; Adams, D. H.; Emoto, M.; Eulenburg, K. and Hamann, A. (2004): The composition of intrahepatic lymphocytes: shaped by selective recruitment?, *Trends in Immunology* 25 [11], pp. 590-594.
- Klugewitz, K.; Blumenthal-Barby, F.; Eulenburg, K.; Emoto, M. and Hamann, A. (2004): The spectrum of lymphoid subsets preferentially recruited into the liver reflects that of resident populations, *Immunology Letters* 93 [2-3], pp. 159-162.
- Klugewitz, K.; Topp, S. A.; Dahmen, U.; Kaiser, T.; Sommer, S.; Kury, E. and Hamann, A. (2002): Differentiation-dependent and subset-specific recruitment of T-helper cells into murine liver, *Hepatology* 35 [3], pp. 568-578.

- Knolle, P. A.; Germann, T.; Treichel, U.; Uhrig, A.; Schmitt, E.; Hegenbarth, S.; Lohse, A. W. and Gerken, G. (1999): Endotoxin down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells, *J Immunol* 162 [3], pp. 1401-7.
- Knolle, P. A. and Limmer, A. (2003): Control of immune responses by scavenger liver endothelial cells, *Swiss Medical Weekly* 133 [37-38], pp. 501-506.
- Knolle, P. A.; Schmitt, E.; Jin, S.; Germann, T.; Duchmann, R.; Hegenbarth, S.; Gerken, G. and Lohse, A. W. (1999): Induction of cytokine production in naive CD4(+) T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells, *Gastroenterology* 116 [6], pp. 1428-40.
- Knolle, P. A.; Uhrig, A.; Hegenbarth, S.; Loser, E.; Schmitt, E.; Gerken, G. and Lohse, A. W. (1998): IL-10 down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells through decreased antigen uptake via the mannose receptor and lowered surface expression of accessory molecules, *Clinical and Experimental Immunology* 114 [3], pp. 427-433.
- Knolle, P.; Schlaak, J.; Uhrig, A.; Kempf, P.; Zumbuschfeld, K. H. M. and Gerken, G. (1995): Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge, *Journal of Hepatology* 22 [2], pp. 226-229.
- Kolios, G.; Valatas, V.; Manousou, P.; Xidakis, C.; Notas, G. and Kouroumalis, E. (2008): Nitric oxide and MCP-1 regulation in LPS activated rat Kupffer cells, *Molecular and Cellular Biochemistry* 319 [1-2], pp. 91-98.
- Komatsu, H.; Koo, A. and Guth, P. H. (1990): Leukocyte flow dynamics in rat-liver microcirculation, *Microvascular Research* 40 [1], pp. 1-13.
- Kong, Q.; Wu, M.; Huan, Y.; Zhang, L.; Liu, H.; Bou, G.; Luo, Y.; Mu, Y. and Liu, Z. (2009): Transgene expression is associated with copy number and cytomegalovirus promoter methylation in transgenic pigs, *PLoS One* 4 [8], p. e6679.
- Kovacsovic-Bankowski, M.; Clark, K.; Benacerraf, B. and Rock, K. L. (1993): Efficient Major Histocompatibility Complex Class-I Presentation of Exogenous Antigen Upon Phagocytosis by Macrophages, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 [11], pp. 4942-4946.
- Kruse, N.; Neumann, K.; Schrage, A.; Derkow, K.; Schott, E.; U., Erben; A., Kühl; Loddenkemper, C.; Zeitz, M.; Hamann, A. and Klugewitz, K. (2009): Priming of CD4+ T cells by liver sinusoidal endothelial cells induces CD25<sup>low</sup>FoxP3<sup>-</sup> regulatory T cells suppressing autoimmune hepatitis, *Hepatology* Aug 4. [Epub ahead of print].
- Kudo, S.; Matsuno, K.; Ezaki, T. and Ogawa, M. (1996): A novel migration pathway for pat dendritic cells from the blood: Hepatic sinusoids-lymph translocation, Venice, Italy.
- Kuppers, R. C. and Henney, C. S. (1977): Studies on the mechanism of lymphocyte-mediated cytolysis. IX. Relationships between antigen recognition and lytic expression in killer T cells, *J Immunol* 118 [1], pp. 71-6.
- Kurts, C. (2000): Cross-presentation: inducing CD8 T cell immunity and tolerance, *Journal of Molecular Medicine-Jmm* 78 [6], pp. 326-332.
- Kurts, C.; Carbone, F. R.; Barnden, M.; Blanas, E.; Allison, J.; Heath, W. R. and Miller, J. F. (1997): CD4+ T cell help impairs CD8+ T cell deletion induced by cross-presentation of self-antigens and favors autoimmunity, *J Exp Med* 186 [12], pp. 2057-62.

- Kurts, C.; Heath, W. R.; Carbone, F. R.; Allison, J.; Miller, J. F. and Kosaka, H. (1996): Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo, *Journal of Experimental Medicine* 184 [3], pp. 923-930.
- Kurts, C.; Kosaka, H.; Carbone, F. R.; Miller, J. F. and Heath, W. R. (1997): Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells, *J Exp Med* 186 [2], pp. 239-45.
- Kurts, C.; Miller, J. F.; Subramaniam, R. M.; Carbone, F. R. and Heath, W. R. (1998): Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction, *J Exp Med* 188 [2], pp. 409-14.
- Kurts, C.; Sutherland, R. M.; Davey, G.; Li, M.; Lew, A. M.; Blanas, E.; Carbone, F. R.; Miller, J. F. and Heath, W. R. (1999): CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 [22], pp. 12703-12707.
- Lahl, K.; Loddenkemper, C.; Drouin, C.; Freyer, J.; Arnason, J.; Eberl, G.; Hamann, A.; Wagner, H.; Huehn, J. and Sparwasser, T. (2007): Selective depletion of Foxp3(+) regulatory T cells induces a scurfy-like disease, *Journal of Experimental Medicine* 204 [1], pp. 57-63.
- Lan, R. Y.; Cheng, C.; Lian, Z. X.; Tsuneyama, K.; Yang, G. X.; Moritoki, Y.; Chuang, Y. H.; Nakamura, T.; Saito, S.; Shimoda, S.; Tanaka, A.; Bowlus, C. L.; Takano, Y.; Ansari, A. A.; Coppel, R. L. and Gershwin, M. E. (2006): Liver-targeted and peripheral blood alterations of regulatory T cells in primary biliary cirrhosis, *Hepatology* 43 [4], pp. 729-737.
- Lan, R. Y. Z.; Salunga, T. L.; Tsuneyama, K.; Lian, Z. X.; Yang, G. X.; Hsu, W.; Moritoki, Y.; Ansari, A. A.; Kemper, C.; Price, J.; Atkinson, J. P.; Coppel, R. L. and Gershwin, M. E. (2009): Hepatic IL-17 responses in human and murine primary biliary cirrhosis, *Journal of Autoimmunity* 32 [1], pp. 43-51.
- Lan, Y. Y.; Tokita, D.; Wang, Z.; Wang, H. C.; Zhan, J.; Brinkmann, V. and Thomson, A. W. (2008): Sphingosine 1-phosphate receptor agonism impairs skin dendritic cell migration and homing to secondary lymphoid tissue: Association with prolonged allograft survival, *Transplant Immunology* 20 [1-2], pp. 88-94.
- Lapierre, P.; Djilali-Saiah, I.; Vitozzi, S. and Alvarez, F. (2004): A murine model of type 2 autoimmune hepatitis: Xenoinmunization with human antigens, *Hepatology* 39 [4], pp. 1066-1074.
- Lecureuil, C.; Saleh, M.C.; Fontaine, I.; Baron, B.; Zakin, M.M. and Guillou, F. (2004): Transgenic mice as a model to study the regulation of human transferrin expression in Sertoli cells, *Hum. Reprod.* 19 [6], pp. 1300-1307.
- Lemmers, A.; Moreno, C.; Gustot, T.; Marechal, R.; Degre, D.; Demetter, P.; de Nadai, P.; Geerts, A.; Quertinmont, E.; Vercruysse, V.; Le Moine, O. and Deviere, J. (2009): The Interleukin-17 Pathway Is Involved in Human Alcoholic Liver Disease, *Hepatology* 49 [2], pp. 646-657.
- Leon, M. P.; Kirby, J. A.; Gibbs, P.; Burt, A. D. and Bassendine, M. F. (1995): Immunogenicity of biliary epithelial-cells - Study of the expression of B7 molecules, *Journal of Hepatology* 22 [5], pp. 591-595.
- Levy, O. (2007): Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates, *Nature Reviews Immunology* 7 [5], pp. 379-390.
- Li, M.; Davey, G. M.; Sutherland, R. M.; Kurts, C.; Lew, A. M.; Hirst, C.; Carbone, F. R. and Heath, W. R. (2001): Cell-Associated Ovalbumin Is Cross-Presented Much More Efficiently than Soluble Ovalbumin In Vivo, *J Immunol* 166 [10], pp. 6099-6103.

- Li, W.; Kuhr, C. S.; Zheng, X. X.; Carper, K.; Thomson, A. W.; Reyes, J. D. and Perkins, J. D. (2008): New insights into mechanisms of spontaneous liver transplant tolerance: The role of Foxp3-expressing CD25(+)CD4(+) regulatory T cells, *American Journal of Transplantation* 8 [8], pp. 1639-1651.
- Limmer, A.; Ohl, J.; Kurts, C.; Ljunggren, H. G.; Reiss, Y.; Groettrup, M.; Momburg, F.; Arnold, B. and Knolle, P. A. (2000): Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance, *Nat Med* 6 [12], pp. 1348-54.
- Limmer, A.; Ohl, J.; Wingender, G.; Berg, M.; Jungerkes, F.; Schumak, B.; Djandji, D.; Scholz, K.; Klevenz, A.; Hegenbarth, S.; Momburg, F.; Hammerling, G. J.; Arnold, B. and Knolle, P. A. (2005): Cross-presentation of oral antigens by liver sinusoidal endothelial cells leads to CD8 T cell tolerance, *Eur J Immunol* 35 [10], pp. 2970-81.
- Limmer, A.; Sacher, T.; Alferink, J.; Kretschmar, M.; Schonrich, G.; Nichterlein, T.; Arnold, B. and Hammerling, G. J. (1998): Failure to induce organ-specific autoimmunity by breaking of tolerance: importance of the microenvironment, *Eur J Immunol* 28 [8], pp. 2395-406.
- Liu, G.; Burns, S.; Huang, G.; Boyd, K.; Proia, R. L.; Flavell, R. A. and Chi, H. (2009): The receptor S1P1 overrides regulatory T cell-mediated immune suppression through Akt-mTOR, *Nat Immunol* 10 [7], pp. 769-777.
- Liu, Y.; Jones, B.; Brady, W.; Janeway, C. A. and Linley, P. S. (1992): Co-Stimulation of Murine Cd4 T-Cell Growth - Cooperation between B7 and Heat-Stable Antigen, *European Journal of Immunology* 22 [11], pp. 2855-2859.
- Lohr, H. F.; Schlaak, J. F.; Gerken, G.; Fleischer, B.; Dienes, H. P. and Zumbuschfeld, K. H. M. (1994): Phenotypical analysis and cytokine release of liver-infiltrating and peripheral-blood T-lymphocytes from patients with chronic hepatitis of different etiology, *Liver* 14 [3], pp. 161-166.
- Lohse, A. W.; Knolle, P. A.; Bilo, K.; Uhrig, A.; Waldmann, C.; Ibe, M.; Schmitt, E.; Gerken, G. and Zumbuschfeld, K. H. M. (1996): Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells, *Gastroenterology* 110 [4], pp. 1175-1181.
- Longhi, M. S.; Hussain, M. J.; Mitry, R. R.; Arora, S. K.; Mieli-Vergani, G.; Vergani, D. and Yun, M. (2006): Functional study of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis, *Journal of Immunology* 176 [7], pp. 4484-4491.
- Longhi, M. S.; Ma, Y.; Bogdanos, D. P.; Cheeseman, P.; Mieli-Vergani, G. and Vergani, D. (2004): Impairment of CD4+CD25+ regulatory T-cells in autoimmune liver disease, *Journal of Hepatology* 41 [1], pp. 31-37.
- Longhi, M. S.; Ma, Y.; Mitry, R. R.; Bogdanos, D. P.; Heneghan, M.; Cheeseman, P.; Mieli-Vergani, G. and Vergani, D. (2005): Effect of CD4+CD25+ regulatory T-cells on CD8 T-cell function in patients with autoimmune hepatitis, *Journal of Autoimmunity* 25 [1], pp. 63-71.
- Longhi, MS; Ma, Y; Mieli-Vergani, G and Vergani, D. (2009): Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis, *Journal of Autoimmunity*.
- Luckashenak, N.; Schroeder, S.; Endt, K.; Schmidt, D.; Mahnke, K.; Bachmann, M. F.; Marconi, P.; Deeg, C. A. and Brocker, T. (2008): Constitutive crosspresentation of tissue antigens by dendritic cells controls CD8(+) T cell tolerance in vivo, *Immunity* 28 [4], pp. 521-532.
- Luth, S.; Huber, S.; Schramm, C.; Buch, T.; Zander, S.; Stadelmann, C.; Bruck, W.; Wraith, D. C.; Herkel, J. and Lohse, A. W. (2008): Ectopic expression of neural autoantigen in mouse liver suppresses experimental autoimmune neuroinflammation by inducing antigen-specific Tregs, *Journal of Clinical Investigation* 118 [10], pp. 3403-3410.

- Macphee, P. J.; Schmidt, E. E. and Groom, A. C. (1995): Intermittence of Blood-Flow in Liver Sinusoids, studied by High-Resolution In-Vivo Microscopy, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 269 [5], pp. G692-G698.
- Mandala, S.; Hajdu, R.; Bergstrom, J.; Quackenbush, E.; Xie, J.; Milligan, J.; Thornton, R.; Shei, G.; Card, D.; Keohane, C.; Rosenbach, M.; Hale, J.; Lynch, C. L.; Rupprecht, K.; Parsons, W. and Rosen, H. (2002): Alteration of Lymphocyte Trafficking by Sphingosine-1-Phosphate Receptor Agonists, *Science* 296 [5566], pp. 346-349.
- Matloubian, M.; Lo, C. G.; Cinamon, G.; Lesneski, M. J.; Xu, Y.; Brinkmann, V.; Allende, M. L.; Proia, R. L. and Cyster, J. G. (2004): Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1, *Nature* 427 [6972], pp. 355-360.
- Matthaei, K. I. (2007): Genetically manipulated mice: a powerful tool with unsuspected caveats, *Journal of Physiology-London* 582 [2], pp. 481-488.
- Medzhitov, R. (2001): Toll-like receptors and innate immunity, *Nature Reviews Immunology* 1 [2], pp. 135-145.
- Mehal, W. Z.; Azzaroli, F. and Crispe, I. N. (2001): Antigen presentation by liver cells controls intrahepatic T cell trapping, whereas bone marrow-derived cells preferentially promote intrahepatic T cell apoptosis, *J Immunol* 167 [2], pp. 667-73.
- Mehal, W. Z.; Juedes, A. E. and Crispe, I. N. (1999): Selective retention of activated CD8<sup>+</sup> T cells by the normal liver, *J Immunol* 163 [6], pp. 3202-10.
- Mempel, T. R.; Pittet, M. J.; Khazaie, K.; Weninger, W.; Weissleder, R.; von Boehmer, H. and von Andrian, U. H. (2006): Regulatory T cells reversibly suppress cytotoxic T cell function independent of effector differentiation, *Immunity* 25 [1], pp. 129-41.
- Morahan, G.; Brennan, F. E.; Bhathal, P. S.; Allison, J.; Cox, K. O. and Miller, J. (1989): Expression in transgenic mice of class-I histocompatibility antigens controlled by the metallothionein promoter, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 [10], pp. 3782-3786.
- Morrison, L. A.; Lukacher, A. E.; Braciale, V. L.; Fan, D. P. and Braciale, T. J. (1986): Differences in Antigen Presentation to Mhc Class-I-Restricted and Class-Ii-Restricted Influenza Virus-Specific Cytolytic Lymphocyte-T Clones, *Journal of Experimental Medicine* 163 [4], pp. 903-921.
- Mosmann, T. R. and Coffman, R. L. (1989): TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties, *Annu Rev Immunol* 7, pp. 145-73.
- Mullershausen, F.; Zecri, F.; Cetin, C.; Billich, A.; Guerini, D. and Seuwen, K. (2009): Persistent signaling induced by FTY720-phosphate is mediated by internalized S1P1 receptors, *Nat Chem Biol* 5 [6], pp. 428-434.
- Nadler, E. P.; Dickinson, E. C.; Beer-Stolz, D.; Alber, S. M.; Watkins, S. C.; Pratt, D. W. and Ford, H. R. (2001): Scavenging nitric oxide reduces hepatocellular injury after endotoxin challenge, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281 [1], pp. G173-181.
- Nemazee, D. (2006): Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance, *Nature Reviews Immunology* 6 [10], pp. 728-740.
- Nishioji, K.; Okanou, T.; Itoh, Y.; Narumi, S.; Sakamoto, M.; Nakamura, H.; Morita, A. and Kashima, K. (2001): Increase of chemokine interferon-inducible protein-10 (IP-10) in the serum of patients with autoimmune liver diseases and increase of its mRNA expression in hepatocytes, *Clin Exp Immunol* 123 [2], pp. 271-9.



- Nishizuk.Y and Sakakura, T. (1969): Thymus and reproduction - sex-linked dysgenesis of gonad after neonatal thymectomy in mice, *Science* 166 [3906], pp. 753-&.
- Norris, S.; Collins, C.; Doherty, D. G.; Smith, F.; McEntee, G.; Traynor, O.; Nolan, N.; Hegarty, J. and O'Farrelly, C. (1998): Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes, *Journal of Hepatology* 28 [1], pp. 84-90.
- O'Connell, P. J.; Morelli, A. E.; Logar, A. J. and Thomson, A. W. (2000): Phenotypic and functional characterization of mouse hepatic CD8 alpha(+) lymphoid-related dendritic cells, *Journal of Immunology* 165 [2], pp. 795-803.
- Onishi, Y.; Fehervari, Z.; Yamaguchi, T. and Sakaguchi, S. (2008): Foxp3(+) natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 [29], pp. 10113-10118.
- Parker, G. A. and Picut, C. A. (2005): Liver immunobiology, *Toxicologic Pathology* 33 [1], pp. 52-62.
- Pillarisetty, V. G.; Shah, A. B.; Miller, G.; Bleier, J. I. and DeMatteo, R. P. (2004): Liver dendritic cells are less immunogenic than spleen dendritic cells because of differences in subtype composition, *Journal of Immunology* 172 [2], pp. 1009-1017.
- Pinschewer, D. D.; Ochsenbein, A. F.; Odermatt, B.; Brinkmann, V.; Hengartner, H. and Zinkernagel, R. M. (2000): FTY720 Immunosuppression Impairs Effector T Cell Peripheral Homing Without Affecting Induction, Expansion, and Memory, *J Immunol* 164 [11], pp. 5761-5770.
- Plitas, G.; Burt, B. M.; Stableford, J. A.; Nguyen, H. M.; Welles, A. P. and DeMatteo, R. P. (2008): Dendritic cells are required for effective cross-presentation in the murine liver, *Hepatology* 47 [4], pp. 1343-1351.
- Ponsioen, C. Y.; Kuiper, H.; Ten Kate, F. J.; de Wit, M. V.; van Deventer, S. J. and Tytgat, G. N. (1999): Immunohistochemical analysis of inflammation in primary sclerosing cholangitis, *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 11 [7], pp. 769-774.
- Pozzi, L. M.; Maciaszek, J. W. and Rock, K. L. (2005): Both Dendritic Cells and Macrophages Can Stimulate Naive CD8 T Cells In Vivo to Proliferate, Develop Effector Function, and Differentiate into Memory Cells, *J Immunol* 175 [4], pp. 2071-2081.
- Qian, S. G.; Lu, L. N.; Fu, F. M.; Li, Y. P.; Li, W.; Starzl, T. E.; Fung, J. J. and Thomson, A. W. (1997): Apoptosis within spontaneously accepted mouse liver allografts - Evidence for deletion of cytotoxic T cells and implications for tolerance induction, *Journal of Immunology* 158 [10], pp. 4654-4661.
- Racanelli, V. and Rehermann, B. (2006): The liver as an immunological organ, *Hepatology* 43 [2], pp. S54-S62.
- Rammensee, H. G.; Kroschewski, R. and Frangoulis, B. (1989): Clonal anergy induced in mature v-beta-6+ lymphocytes on immunizing MLS-1B mice with MLS-1A expressing cells, *Nature* 339 [6225], pp. 541-544.
- Rieber, E. P., Frank K.-H. (2001): Grundlagen der Immunologie, Skript zur Vorlesung "Immunologie für Studierende der Biologie", SS 2001, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden
- Robinson, R. T.; Wang, J.; Cripps, J. G.; Milks, M. W.; English, K. A.; Pearson, T. A. and Gorham, J. D. (2009): End-Organ Damage in a Mouse Model of Fulminant Liver Inflammation Requires CD4(+)

- T Cell Production of IFN-gamma but Is Independent of Fas, *Journal of Immunology* 182 [5], pp. 3278-3284.
- Rocha, B. and Vonboehmer, H. (1991): Peripheral selection of the T-cell repertoire, *Science* 251 [4998], pp. 1225-1228.
- Rocken, M.; Urban, J. F. and Shevach, E. M. (1992): Infection Breaks T-Cell Tolerance, *Nature* 359 [6390], pp. 79-82.
- Rothoef, T.; Gonschorek, A.; Bartz, H.; Anhen, O. and Schauer, U. (2003): Antigen dose, type of antigen-presenting cell and time of differentiation contribute to the T helper 1/T helper 2 polarization of naive T cells, *Immunology* 110 [4], pp. 430-439.
- Sacher, T.; Knolle, P.; Nichterlein, T.; Arnold, B.; Hammerling, G. J. and Limmer, A. (2002): CpG-ODN-induced inflammation is sufficient to cause T-cell-mediated autoaggression against hepatocytes, *European Journal of Immunology* 32 [12], pp. 3628-3637.
- Sakaguchi, S. (2004): Naturally Arising CD4+ Regulatory T Cells for Immunologic Self-Tolerance and Negative Control of Immune Responses, *Annu Rev Immunol* 22, pp. 531-562.
- Sakaguchi, Shimon; Yamaguchi, Tomoyuki; Nomura, Takashi and Ono, Masahiro (2008): Regulatory T Cells and Immune Tolerance, *Cell* 133 [5], pp. 775-787.
- Sanchez, O.; Arnau, A.; Pareja, M.; Poch, E.; Ramirez, I. and Soley, M. (2002): Acute stress-induced tissue injury in mice: differences between emotional and social stress, *Cell Stress Chaperones* 7 [1], pp. 36-46.
- Sanchez, O.; Viladrich, M.I.; Ramirez, I. and Soley, M. (2007): Liver injury after an aggressive encounter in male mice, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293 [5], pp. R1908-1916.
- Santodomingo-Garzon, T.; Han, J.; Le, T.; Yang, Y. and Swain, M. G. (2009): Natural killer T cells regulate the homing of chemokine CXC receptor 3-positive regulatory T cells to the liver in mice, *Hepatology* 49 [4], pp. 1267-76.
- Sato, M.; Suzuki, S. and Senoo, H. (2003): Hepatic stellate cells: Unique characteristics in cell biology and phenotype, *Cell Structure and Function* 28 [2], pp. 105-112.
- Saurer, L. and Mueller, C. (2009): T cell-mediated immunoregulation in the gastrointestinal tract, *Allergy* 64 [4], pp. 505-519.
- Sawicka, E.; Dubois, G.; Jarai, G.; Edwards, M.; Thomas, M.; Nicholls, A.; Albert, R.; Newson, C.; Brinkmann, V. and Walker, C. (2005): The Sphingosine 1-Phosphate Receptor Agonist FTY720 Differentially Affects the Sequestration of CD4+/CD25+ T-Regulatory Cells and Enhances Their Functional Activity, *J Immunol* 175 [12], pp. 7973-7980.
- Scheiffarth, F.; Warnatz, H. and Mayer, K. (1967): Studies concerning the importance of mononuclear cells in the development of experimental hepatitis, *J Immunol* 98 [2], pp. 396-401.
- Scheiffarth, F.; Warnatz, H. and Niederer, W. (1965): [Animal experiment studies on the pathogenesis of chronic hepatitis. I. Morphological liver studies following sensitization with homologous liver cell fractions], *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 339 [4], pp. 358-63.
- Schildknecht, A.; Probst, H. C.; McCoy, K. D.; Miescher, I.; Brenner, C.; Leone, D. P.; Suter, U.; Ohashi, P. S. and van den Broek, M. (2009): Antigens expressed by myelinating glia cells induce peripheral cross-tolerance of endogenous CD8(+) T cells, *European Journal of Immunology* 39 [6], pp. 1505-1515.

- Schlaak, J. F.; Lohr, H.; Gallati, H. and Zumbuschfeld, K. H. M. (1993): Analysis of the In-Vitro Cytokine Production by Liver-Infiltrating T-Cells of Patients with Autoimmune Hepatitis, *Clinical and Experimental Immunology* 94 [1], pp. 168-173.
- Scholz, C. and Tampe, R. (2009): The peptide-loading complex - antigen translocation and MHC class I loading, *Biological Chemistry* 390 [8], pp. 783-794.
- Schonrich, G.; Kalinke, U.; Momburg, F.; Malissen, M.; Schmittverhulst, A. M.; Malissen, B.; Hammerling, G. J. and Arnold, B. (1991): Down-Regulation of T-Cell Receptors on Self-Reactive T-Cells as a Novel Mechanism for Extrathymic Tolerance Induction, *Cell* 65 [2], pp. 293-304.
- Schonrich, G.; Momburg, F.; Malissen, M.; Schmitt-Verhulst, A. M.; Malissen, B.; Hammerling, G. J. and Arnold, B. (1992): Distinct mechanisms of extrathymic T cell tolerance due to differential expression of self antigen, *Int Immunol* 4 [5], pp. 581-90.
- Schrage, A.; Wechsung, K.; Neumann, K.; Schumann, M.; Schulzke, J. D.; Engelhardt, B.; Zeitz, M.; Hamann, A. and Klugewitz, K. (2008): Enhanced T cell transmigration across the murine liver sinusoidal endothelium is mediated by transcytosis and surface presentation of chemokines, *Hepatology* 48 [4], pp. 1262-1272.
- Schurich, A.; Bottcher, J. P.; Burgdorf, S.; Penzler, P.; Hegenbarth, S.; Kern, M.; Dolf, A.; Endl, E.; Schultze, J.; Wiertz, E.; Stabenow, D.; Kurts, C. and Knolle, P. (2009): Distinct Kinetics and Dynamics of Cross-Presentation in Liver Sinusoidal Endothelial Cells Compared to Dendritic Cells, *Hepatology* 50 [3], pp. 909-919.
- Sebzda, E.; Mariathasan, S.; Ohteki, T.; Jones, R.; Bachmann, M. F. and Ohashi, P. S. (1999): Selection of the T cell repertoire, *Annual Review of Immunology* 17, pp. 829-874.
- Senaldi, G.; Portmann, B.; Mowat, A. P.; Mielivergani, G. and Vergani, D. (1992): Immunohistochemical Features of the Portal Tract Mononuclear Cell Infiltrate in Chronic Aggressive Hepatitis, *Archives of Disease in Childhood* 67 [12], pp. 1447-1453.
- Shetty, S.; Lalor, P. F. and Adams, D. H. (2008): Lymphocyte recruitment to the liver: Molecular insights into the pathogenesis of liver injury and hepatitis, *Toxicology* 254 [3], pp. 136-146.
- Shevach, E. M. (2009): Mechanisms of Foxp3(+) T Regulatory Cell-Mediated Suppression, *Immunity* 30 [5], pp. 636-645.
- Shimoda, S.; Van de Water, J.; Ansari, A.; Nakamura, M.; Ishibashi, H.; Coppel, R. L.; Lake, J.; Keeffe, E. B.; Roche, T. E. and Gershwin, M. E. (1998): Identification and precursor frequency analysis of a common T cell epitope motif in mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis, *Journal of Clinical Investigation* 102 [10], pp. 1831-1840.
- Smith-Garvin, J. E.; Koretzky, G. A. and Jordan, M. S. (2009): T Cell Activation, *Annual Review of Immunology* 27, pp. 591-619.
- Sow, A.; Lamant, M.; Bonny, J. M.; Larvaron, P.; Piand, O.; Lecureuil, C.; Fontaine, I.; Saleh, M. C.; Otin, A. L. G.; Renou, J. P.; Baron, B.; Zakin, M. and Guillou, F. (2006): Oligodendrocyte differentiation is increased in transferrin transgenic mice, *Journal of Neuroscience Research* 83 [3], pp. 403-414.
- Sprengers, D.; Sille, F. C. M.; Derkow, K.; Besra, G. S.; Janssen, H. L. A.; Schott, E. and Boes, M. (2008): Critical role for CD1d-restricted invariant NKT cells in stimulating intrahepatic CD8 T-cell responses to liver antigen, *Gastroenterology* 134 [7], pp. 2132-2143.
- Springer, T A (1995): Traffic Signals on Endothelium for Lymphocyte Recirculation and Leukocyte Emigration, *Annual Review of Physiology* 57 [1], pp. 827-872.

- Steimle, V.; Siegrist, C. A.; Mottet, A.; Lisowska-Grospierre, B. and Mach, B. (1994): Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA, *Science* 265 [5168], pp. 106-9.
- Steinman, R. M. and Nussenzweig, M. C. (2002): Avoiding horror autotoxicus: The importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 [1], pp. 351-358.
- Suda, T.; Takahashi, T.; Golstein, P. and Nagata, S. (1993): Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family, *Cell* 75 [6], pp. 1169-78.
- Sun, C.-M.; Hall, J. A.; Blank, R. B.; Bouladoux, N.; Oukka, M.; Mora, J. R. and Belkaid, Y. (2007): Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid, *J. Exp. Med.* 204 [8], pp. 1775-1785.
- Sun, Z. L.; Wada, T.; Maemura, K.; Uchikura, K.; Hoshino, S.; Diehl, A. M. and Klein, A. S. (2003): Hepatic allograft-derived Kupffer cells regulate T cell response in rats, *Liver Transplantation* 9 [5], pp. 489-497.
- Suzuki, Y.; Kobayashi, M.; Hosaka, T.; Someya, T.; Akuta, N.; Suzuki, F.; Tsubota, A.; Saitoh, S.; Arase, Y.; Ikeda, K.; Matsuda, M.; Sato, J.; Miyakawa, Y. and Kumada, H. (2004): Peripheral CD8<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> lymphocytes may be implicated in hepatocellular injuries in patients with acute-onset autoimmune hepatitis, *Journal of Gastroenterology* 39 [7], pp. 649-653.
- Takeda, K.; Hayakawa, Y.; Van Kaer, L.; Matsuda, H.; Yagita, H. and Okumura, K. (2000): Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 [10], pp. 5498-5503.
- Tiegs, G.; Hentschel, J. and Wendel, A. (1992): A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A, *J Clin Invest* 90 [1], pp. 196-203.
- Toyonaga, T.; Hino, O.; Sugai, S.; Wakasugi, S.; Abe, K.; Shichiri, M. and Yamamura, K. (1994): Chronic Active Hepatitis in Transgenic Mice Expressing Interferon-Gamma in the Liver, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 [2], pp. 614-618.
- Trobonjaca, Z.; Leithauser, F.; Moller, P.; Schirmbeck, R. and Reimann, J. (2001): Activating Immunity in the Liver. I. Liver Dendritic Cells (but Not Hepatocytes) Are Potent Activators of IFN- $\gamma$  Release by Liver NKT Cells, *J Immunol* 167 [3], pp. 1413-1422.
- Vanrooijen, N.; Kors, N.; Vanderende, M. and Dijkstra, C. D. (1990): Depletion and Repopulation of Macrophages in Spleen and Liver of Rat after Intravenous Treatment with Liposome-Encapsulated Dichloromethylene Diphosphonate, *Cell and Tissue Research* 260 [2], pp. 215-222.
- Vergani, D.; Longhi, M. S.; Bogdanos, D. P.; Ma, Y. and Mieli-Vergani, G. (2009): Autoimmune hepatitis, *Seminars in Immunopathology* 31 [3], pp. 421-435.
- Vezy's, V. and Lefrancois, L. (2002): Cutting edge: Inflammatory signals drive organ-specific autoimmunity to normally cross-tolerizing endogenous antigen, *Journal of Immunology* 169 [12], pp. 6677-6680.
- Vezy's, V.; Olson, S. and Lefrancois, L. (2000): Expression of intestine-specific antigen reveals novel pathways of CD8 T cell tolerance induction, *Immunity* 12 [5], pp. 505-14.
- Vierling, J. M. (2001): Animal models for primary sclerosing cholangitis, *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 15 [4], pp. 591-610.

- Vinas, O.; Bataller, R.; Sancho-Bru, P.; Gines, P.; Berenguer, C.; Enrich, C.; Nicolas, J. M.; Ercilla, G.; Gallart, T.; Vives, J.; Arroyo, V. and Rodes, J. (2003): Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation, *Hepatology* 38 [4], pp. 919-929.
- Voehringer, D.; Blaser, C.; Grawitz, A. B.; Chisari, F. V.; Buerki, K. and Pircher, H. (2000): Break of T cell ignorance to a viral antigen in the liver induces hepatitis, *J Immunol* 165 [5], pp. 2415-22.
- von Oppen, N.; Schurich, A.; Hegenbarth, S.; Stabenow, D.; Tolba, R.; Weiskirchen, R.; Geerts, A.; Kolanus, W.; Knolle, P. and Diehl, L. (2009): Systemic Antigen Cross-Presented by Liver Sinusoidal Endothelial Cells Induces Liver-Specific CD8 T-Cell Retention and Tolerization, *Hepatology* 49 [5], pp. 1664-1672.
- Wahl, C.; Bochtler, P.; Chen, L. P.; Schirmbeck, R. and Reimann, J. (2008): B7-H1 on hepatocytes facilitates priming of specific CD8 T cells but limits the specific recall of primed responses, *Gastroenterology* 135 [3], pp. 980-988.
- Warren, A.; Le Couteur, D. G.; Fraser, R.; Bowen, D. G.; McCaughan, G. W. and Bertolino, P. (2006): T lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells, *Hepatology* 44 [5], pp. 1182-1190.
- Watts, C. (2004): The exogenous pathway for antigen presentation on major histocompatibility complex class II and CD1 molecules, *Nature Immunology* 5 [7], pp. 685-692.
- Webb, S.; Morris, C. and Sprent, J. (1990): Extrathymic tolerance of mature T cells: Clonal elimination as a consequence of immunity, *Cell* 63 [6], pp. 1249-1256.
- Wei, H. X.; Chuang, Y. H.; Li, B. F.; Wei, H. M.; Sun, R.; Moritoki, Y.; Gershwin, M. E.; Lian, Z. X. and Tian, Z. G. (2008): CD4(+)CD25(+) Foxp3(+) Regulatory T Cells Protect against T Cell-Mediated Fulminant Hepatitis in a TGF-beta-Dependent Manner in Mice, *Journal of Immunology* 181 [10], pp. 7221-7229.
- Wiegard, C.; Frenzel, C.; Herkel, J.; Kallen, K. J.; Schmitt, E. and Lohse, A. W. (2005): Murine liver antigen presenting cells control suppressor activity of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells, *Hepatology* 42 [1], pp. 193-199.
- Wiegard, C.; Wolint, P.; Frenzel, C.; Cheruti, U.; Schmitt, E.; Oxenius, A.; Lohse, A. W. and Herkel, J. (2007): Defective T helper response of hepatocyte-stimulated CD4 T cells impairs antiviral CD8 response and viral clearance, *Gastroenterology* 133 [6], pp. 2010-2018.
- Winau, F.; Hegasy, G.; Weiskirchen, R.; Weber, S.; Cassan, C.; Sieling, P. A.; Modlin, R. L.; Liblau, R. S.; Gressner, A. M. and Kaufmann, S. H. E. (2007): Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses, *Immunity* 26 [1], pp. 117-129.
- Winau, F.; Quack, C.; Darmoise, A. and Kaufmann, S. H. (2008): Starring stellate cells in liver immunology, *Current Opinion in Immunology* 20 [1], pp. 68-74.
- Wisse, E.; Dezanger, R. B.; Charels, K.; Vandersmissen, P. and McCuskey, R. S. (1985): The liver sieve - Considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse, *Hepatology* 5 [4], pp. 683-692.
- Wong, J.; Johnston, B.; Lee, S. S.; Bullard, D. C.; Smith, C. W.; Beaudet, A. L. and Kubes, P. (1997): A minimal role for selectins in the recruitment of leukocytes into the inflamed liver microvasculature, *Journal of Clinical Investigation* 99 [11], pp. 2782-2790.
- Wucherpfennig, K. W. and Strominger, J. L. (1995): Molecular Mimicry in T-Cell-Mediated Autoimmunity - Viral Peptides Activate Human T-Cell Clones Specific for Myelin Basic-Protein, *Cell* 80 [5], pp. 695-705.

- Wuensch, S. A.; Pierce, R. H. and Crispe, I. N. (2006): Local intrahepatic CD8<sup>+</sup> T cell activation by a non-self-antigen results in full functional differentiation, *J Immunol* 177 [3], pp. 1689-97.
- Yeaman, S. J.; Danner, D. J.; Mutimer, D. J.; Fussey, S. P. M.; James, O. F. W. and Bassendine, M. F. (1988): Primary biliary cirrhosis - Identification of 2 major M2 mitochondrial auto-antigens, *Lancet* 1 [8594], pp. 1067-1070.
- You, Q.; Cheng, L. L.; Kedl, R. M. and Ju, C. (2008): Mechanism of T cell tolerance induction by murine hepatic Kupffer cells, *Hepatology* 48 [3], pp. 978-990.
- Yu, M. C.; Chen, C. H.; Liang, X. Y.; Wang, L. F.; Gandhi, C. R.; Fung, J. J.; Lu, L. and Qian, S. G. (2004): Inhibition of T-cell responses by hepatic stellate cells via B7-H1-mediated T-cell apoptosis in mice, *Hepatology* 40 [6], pp. 1312-1321.
- Zehn, D. and Bevan, M. J. (2006): T cells with low avidity for a tissue-restricted antigen routinely evade central and peripheral tolerance and cause autoimmunity, *Immunity* 25 [2], pp. 261-270.
- Zhang, J.Y. ; Zhang, Z.; Lin, F.; Zou, Z.S. ; Xu, R.N. ; Jin, L. ; Fu, J.L. ; Shi, F.; Shi, M.; Wang, H.F. and Wang, F.S. (2009): Interleukin-17-producing CD4(+) T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B., *Hepatology* Sep 9. [Epub ahead of print].
- Zhang, LI; Martin, DR; Fung-Leung, WP; Teh, HS and Miller, RG (1992): Peripheral deletion of mature CD8<sup>+</sup> antigen-specific T cells after in vivo exposure to male antigen, *J Immunol* 148 [12], pp. 3740-3745.
- Zhang, N.; Schroppel, B.; Lal, G.; Jakubzick, C.; Mao, X.; Chen, D.; Yin, N.; Jessberger, R.; Ochando, J. C.; Ding, Y. and Bromberg, J. S. (2009): Regulatory T cells sequentially migrate from inflamed tissues to draining lymph nodes to suppress the alloimmune response, *Immunity* 30 [3], pp. 458-69.
- Zheng, S. G.; Wang, J.; Wang, P.; Gray, J. D. and Horwitz, D. A. (2007): IL-2 Is Essential for TGF-beta to Convert Naive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Cells to CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells and for Expansion of These Cells, *J Immunol* 178 [4], pp. 2018-2027.
- Zijlstra, M.; Bix, M.; Simister, N. E.; Loring, J. M.; Raulet, D. H. and Jaenisch, R. (1990): Beta-2-Microglobulin Deficient Mice Lack Cd4-8<sup>+</sup> Cytolytic T-Cells, *Nature* 344 [6268], pp. 742-746.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst gilt mein besonderer Dank Herrn PD Dr. Eckart Schott für die Überlassung des Themas, seine Betreuung sowie die vielen Diskussionen und wertvollen Ratschläge bei der Anfertigung dieser Arbeit. Ich danke Herrn Prof. Dr. Alf Hamann für die freundliche und unkomplizierte Unterstützung und Übernahme der Begutachtung dieser Doktorarbeit von Seiten der Humboldt-Universität zu Berlin. Ich danke auch Herrn Prof. Dr. Bertram Wiedenmann für Möglichkeit die vorliegende Arbeit in der Forschungsabteilung der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie der Charité Universitätsmedizin, Campus Virchow Klinikum, anzufertigen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Christoph Loddenkemper und Frau Simone Spieckermann für die Hilfe bei der Durchführung der histologischen Färbungen sowie Herrn Prof. Dr. Tim Sparwasser und Herrn Prof. Dr. Jochen Hühn für die Überlassung der DEREK-Mäuse. Außerdem möchte ich mich bei Nils Kruse für die praktische Unterstützung und Hilfe bei der Generierung der Knochenmarkchimären bedanken. Marcos Vicinius Rust Moreira danke ich für seine Mitarbeit bei der Erzeugung der Th1-Kulturen. Bei allen Mitarbeitern des Labors der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie bedanke ich mich sehr herzlich für die angenehme Atmosphäre im Labor und ihre große Hilfsbereitschaft.

Ein großes Dankeschön geht außerdem an alle Freunde, die vor allem in den letzten Monaten für mich da waren und mich unterstützt haben. Ganz speziell danke ich Petra und Ira für ihre Geduld und das Korrekturlesen der Arbeit!

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern sowie meiner Schwester und Ihrer Familie, die mich immer in allen Situationen unterstützen und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stehen.

## **Anhang**

### **Lebenslauf**



## Veröffentlichungen

### Publikationen:

Kruse N, Neumann K, Schrage A, Derkow K, Schott E, Erben U, Kühl A, Loddenkemper C, Zeitz M, Hamann A, Klugewitz K. (2009) Priming of CD4<sup>+</sup> T cells by liver sinusoidal endothelial cells induces CD25<sup>low</sup>FoxP3<sup>-</sup> regulatory T cells suppressing autoimmune hepatitis. *Hepatology*, 50(6):1904-1913.

Sprengers D, Sillé FC, Derkow K, Besra GS, Janssen HL, Schott E, Boes M. (2008) Critical role for CD1d-restricted invariant NKT cells in stimulating intrahepatic CD8 T-cell responses to liver antigen. *Gastroenterology*. 134(7):2132-43.

Olsson A, Norberg M, Okvist A, Derkow K, Choudhury A, Tobin G, Celsing F, Osterborg A, Rosenquist R, Jondal M, Osorio LM. (2007) Upregulation of bfl-1 is a potential mechanism of chemoresistance in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Cancer*. 97(6):769-77.

Derkow K, Loddenkemper C, Mintern J, Kruse N, Klugewitz K, Berg T, Wiedenmann B, Ploegh HL, Schott E. (2007) Differential priming of CD8 and CD4 T-cells in animal models of autoimmune hepatitis and cholangitis. *Hepatology*. 46(4):1155-65.

Scholz A, Rehm VA, Rieke S, Derkow K, Schulz P, Neumann K, Koch I, Pascu M, Wiedenmann B, Berg T, Schott E. (2007) Angiopoietin-2 serum levels are elevated in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol*. 102(11):2471-81.

Mahdian R, Kokhaei P, Najari HM, Derkow K, Choudhury A, Mellstedt H. (2006) Dendritic cells, pulsed with lysate of allogeneic tumor cells, are capable of stimulating MHC-restricted antigen-specific antitumor T cells. *Med Oncol*. 23(2):273-82.

### Manuskript in Vorbereitung:

Derkow K, Loddenkemper C, Eickmeier I, Seidel D, Rust M, Kruse N, Klugewitz K, Mintern J, Wiedenmann B, Mittrücker HW, Schott E  
CD4 T-cells suppress but provide little support for CD8 T-cells in a transgenic mouse model of autoimmune hepatitis

### Posterpräsentationen:

Derkow, K, Seidel, D, Eickmeier, I, Wiedenmann, B, Schott, E. Inefficient priming of CD4 T-cells by liver-derived antigen in a mouse model of autoimmune hepatitis. 44<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver 2009, Copenhagen, Denmark

Derkow, K, Loddenkemper, C, Eickmeier, I, Seidel, D, Wiedenmann, B, Schott, E. The role of CD4 T-cells in a mouse model of autoimmune hepatitis. 43<sup>rd</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver 2008, Milan, Italy

Derkow, K, Kruse, N, Klugewitz, K, Wiedenmann, B, Schott, E. Antigen presentation by bone-marrow derived antigen presenting cells is required for effective T-cell priming in an animal model of autoimmune liver disease. 42<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver 2007, Barcelona, Spain

**Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt worden ist.

Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze einen entsprechenden Doktorgrad nicht.

Ich erkläre die Kenntnisnahme der dem Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin.