

**Der enterohepatische Kreislauf von T-Lymphozyten
für die Entwicklung einer immunvermittelten Cholangitis
bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

vorgelegt von
Diplom-Ingenieur
Daniel Seidel
geboren in Berlin

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzende: Prof. Dr. Vera Meyer

Gutachter: Prof. Dr. Roland Lauster

Gutachter: Prof. Dr. Eckart Schott

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 4. August 2015

Berlin 2015

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung	III
Summary	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis.....	IX
1. Einleitung	1
1.1 Angeborene und adaptive Immunabwehr	1
1.2 Migration von Lymphozyten.....	5
1.3 Immunologie des Darms	7
1.4 Immunologie der Leber.....	10
1.5 Primär sklerosierende Cholangitis.....	14
1.6 Dysbiose durch Infektion	17
1.7 Mausmodelle.....	19
2. Fragestellung	22
3. Ergebnisse	24
3.1 Modell einer Antigen-abhängigen Kolitis in Mäusen: OVA-Kolitis.....	24
3.2 Im Darm aktivierte CD8 T-Zellen migrieren in die Leber.....	29
3.3 Im Darm aktivierte CD8 T-Zellen lösen eine immunvermittelte Cholangitis aus.....	33
3.4 <i>In vitro</i> aktivierte CD8 T-Zellen führen nicht zu einer Cholangitis	37
3.5 Chronische Kolitis führt zu einem pro-inflammatorischen Milieu in der Leber	39
3.6 Chronische Kolitis fördert die Induktion einer immunvermittelten Cholangitis.....	44
3.7 Im Dünndarm aktivierte CD8 T-Zellen lösen eine immunvermittelte Cholangitis aus..	46
3.8 Infektion mit <i>Salmonella</i> im Darm begünstigt die Aktivierung von T-Zellen	52
3.9 Infektion mit <i>Salmonella</i> verstärkt eine immunvermittelte Cholangitis.....	59
4. Diskussion	65
4.1 Aktivierung von T-Zellen im Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe.....	65
4.2 Aktivierung von T-Zellen in der Leber	74
4.3 Enterohepatische Migration	77
4.4 Klinischer Kontext	90
4.5 Ausblick	95
5. Material und Methoden	97
5.1 Materialien und Geräte.....	97
5.2 Tiere	104
5.3 Kolitis-Modelle.....	107
5.4 Infektion.....	109
5.5 Endoskopie.....	110

5.6	Blutanalyse.....	111
5.7	Isolation von Lymphozyten	112
5.8	Zellzahlbestimmung	114
5.9	MACS.....	114
5.10	Durchflusszytometrie	115
5.11	<i>In vitro</i> Aktivierung von CD8 T-Zellen.....	116
5.12	Proliferations-Assay	116
5.13	Restimulation <i>in vitro</i>	117
5.14	<i>In vivo</i> Zytolyse-Assay.....	118
5.15	RNA-Isolation und reverse Transkription.....	119
5.16	<i>Realtime</i> RT-PCR	121
5.17	Histologie.....	123
5.18	Statistik	127
6.	Anhang.....	128
6.1	Ergänzende Abbildungen und Tabellen	128
6.2	Literaturverzeichnis.....	131
6.3	Danksagung.....	148
6.4	Lebenslauf.....	149
6.5	Publikationen.....	150
6.6	Eidesstattliche Versicherung.....	151

Zusammenfassung

Die Primäre sklerosierende Cholangitis (PSC) ist eine chronisch rezidivierende Entzündung der extra- und intrahepatischen Gallengänge bislang unbekannter Ursache, welche eng mit einer chronischen Kolitis assoziiert ist. Dabei weisen die in der Leber von PSC-Patienten vermehrt vorkommenden T-Zellen einem Darm-*Homing* Phänotyp auf, was zu der Hypothese führte, dass im Darm aktivierte T-Zellen ursächlich an der Pathogenese der PSC beteiligt sein könnten (Grant *et al.*, 2002).

Da die PSC meist erst in einem relativ fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird, wurden für die Analyse der initialen Prozesse der Pathogenese transgene Mäuse verwendet, die das Modellantigen Ovalbumin (OVA) spezifisch in den Cholangiozyten exprimieren. Um in diesen Mäusen die Rolle der enterohepatischen Migration für die Induktion einer immunvermittelten Cholangitis näher zu charakterisieren, wurden transgene OVA-spezifische CD8 OT-I T-Zellen mittels eines neu entwickelten, Antigen-abhängigen Kolitis-Modells, einer transgenen OVA-Expression in Enterozyten oder eines chronischen Kolitis-Modells im Darm aktiviert sowie eine transiente intestinale Infektion dazu benutzt, das in Enterozyten exprimierte Modellantigen in einen inflammatorischen Kontext zu bringen.

Die intra-rektale Applikation von OVA führte zu einer Antigen-abhängigen transienten Kolitis. Die so im Darm aktivierten OVA-spezifischen CD8 OT-I T-Zellen differenzierten zu Effektorzellen und zeigten eine zum Teil Integrin $\alpha 4$ vermittelte präferentielle Migration in die Leber, wo sie eine immunvermittelte Cholangitis induzierten, wenn OVA in Cholangiozyten exprimiert wurde. Auch in Mäusen, die das Modellantigen OVA gleichzeitig in Dünndarm-Enterozyten und Cholangiozyten exprimieren, kam es nach den adoptiven CD8 OT-I T-Zell-Transfer zu einer transienten Cholangitis, welche durch eine vorausgehende intestinale *Salmonella*-Infektion verstärkt wurde. In Mäusen mit einer chronischen Kolitis kam es wie bei PSC-Patienten zu einer starken Heraufregulation der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 auf den Leber-Endothelien sowie zu einer erhöhten hepatischen Expression von TNF- α , IL-18, CCL25 und CXCL10. Daneben führte die erhöhte Translokation von Zytokinen wie TNF- α , IFN- γ und IL-6 aus dem Darm in das portalvenöse Blut zur Reifung von Dendritischen Zellen in der Leber, was die Induktion einer T-Zell-abhängigen Cholangitis förderte.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die Präsenz einer Kolitis mit der Induktion einer Antigen-abhängigen Cholangitis im Mausmodell verknüpft, was darauf hindeutet, dass die enterohepatische Migration im Darm aktivierter T-Zellen ursächlich an der Pathogenese der PSC beteiligt sein könnte.

Summary

Primary sclerosing cholangitis (PSC) is a chronic recurrent inflammation of the extra- and intrahepatic bile ducts of hitherto unknown aetiology, which is closely associated with chronic colitis. In patients with PSC, liver-infiltrating T cells display a gut-homing phenotype, which lead to the hypothesis, that T cells activated in the gut could be causally involved in the pathogenesis of PSC (Grant *et al.*, 2002).

Since PSC is usually diagnosed in an advanced stage, transgenic mice, which specifically express the model antigen ovalbumin (OVA) in cholangiocytes, were used to analyse the initial processes of pathogenesis. In order to characterize the role of the enterohepatic migration for the induction of an immune-mediated cholangitis in these mice, transgenic OVA-specific CD8 OT-I T cells were activated in the gut by means of a newly developed, antigen-dependent colitis model, by transgenic OVA-expression in enterocytes or by a chronic colitis model. Also a transient intestinal infection was used, to bring the model antigen OVA expressed in enterocytes into an inflammatory context.

The intra-rectal administration of OVA resulted in an antigen-dependent transient colitis. The gut activated OVA-specific CD8 T cells differentiated into effector cells and showed a partially $\alpha 4$ integrin-mediated, preferential migration to the liver, where they induced immune-mediated cholangitis. In mice expressing the model antigen OVA simultaneously in enterocytes and cholangiocytes, the adoptive transfer of OVA₂₅₇₋₂₆₄ specific CD8 T cells led to transient cholangitis, which was aggravated by a preceding intestinal *Salmonella* infection. As in the liver of PSC patients, mice with chronic colitis showed a strong up-regulation of the adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in endothelial cells, as well as increased hepatic expression of TNF- α , IL-18, CCL25, and CXCL10. In addition the increased translocation of cytokines such as TNF- α , IFN- γ and IL-6 from the intestine into the portal venous blood led to the maturation of dendritic cells in the liver, which promoted the induction of T-cell-dependent cholangitis.

In this work, the presence of colitis was linked for the first time with the induction of an antigen-dependent cholangitis in a mouse model, suggesting that the enterohepatic migration of T-cells activated in the gut could be causally involved in the pathogenesis of the PSC.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALT	Alanin-Aminotransferase
APC	Antigen-präsentierende Zelle (<i>Antigen Presenting Cell</i>)
ASBT	<i>Apical Sodium Bile Transporter</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumine</i>)
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CCL	<i>Chemokine (C-C motif) ligand</i>
CCR	<i>Chemokine (C-C motif) receptor</i>
CD	Oberflächenantigen (<i>Cluster of Differentiation</i>)
cDNA	<i>Copy DNA</i>
CED	chronisch entzündlichen Darmerkrankungen
CFSE	Carboxyfluorescein-succinimidylester
CK19	Cytokeratin 19
cLPL	Lamina propria Lymphozyten des Kolons
Ct	<i>Threshold Cycle</i>
CXCL	<i>Chemokine (C-X-C motif) Ligand</i>
CXCR	<i>Chemokine (C-X-C motif) Receptor</i>
DAB	Diaminobenzidin
DAMP	Gefahren-assoziierte molekulare Muster (<i>Danger-Associated Molecular Pattern</i>)
DC	Dendritische Zelle (<i>Dendritic Cell</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribinuklease
DNBS	2,4-Dinitrobenzensulfonsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
DSS	Natriumdextransulfat
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
DTT	Dithiothreithol
E	PCR-Effizienz
ER	endoplasmatischem Retikulum
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>Forward Scatter</i>)
GALT	Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe (<i>Gut Associated Lymphatic Tissue</i>)
Gl.	Gleichung

H/E	Hämatoxylin-Eosin
HEV	hochendotheliale Venolen (<i>High Endothelial Venules</i>)
HPF	Hauptgesichtsfelder (<i>High Power Field</i>)
Hsp	<i>Heat shock Protein</i>
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
IEC	intestinale Epithelzellen
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten
IFABP	<i>Intestinal Fatty Acid Binding Protein</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	<i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>
Iso	Isotyp Antikörper
ivCTL	<i>in vivo</i> Zytolyse
i.p.	<i>intra-peritoneal</i>
i.v.	<i>intra-venös</i>
KC	Kupffer Zelle
KBE	Kolonie-bildende Einheit
kDa	Kilo-Dalton
KIR	<i>Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor</i>
LFA-1	<i>Leukocyte Function-Associated antigen-1</i>
LMP7	<i>Large Multifunctional Peptidase 7</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LSEC	Leber-sinusoidale Endothelzellen (<i>Liver Sinusoidal Endothel Cell</i>)
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MAdCAM	<i>Mucosal Vascular Addressin Cell Adhesion Molecule</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1 (CCL2)</i>
mDC	myeloide DC
mLN	mesenteriale Lymphknoten (<i>mesenteric Lymph Nodes</i>)
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MPO	myeloide Peroxidase
MW	Mittelwert
M-Zelle	Mikrofalten-Zelle
NK	natürliche Killerzelle
NLR	<i>NOD-like</i> -Rezeptoren
NOD	Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomänen
OVA	Ovalbumin
p.i.	<i>post infection</i>

p.o.	<i>per os</i>
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>)
p-ANCA	perinukleäre Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pDC	plasmazytoide Dendritische Zelle
PD-1	<i>Programmed Cell Death Protein-1</i>
PD-L1	<i>Programmed Cell Death Protein -1 Ligand</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PNA _d	<i>Peripheral Node Addressins</i>
POD	Peroxidase
PRR	Mustererkennungsrezeptoren (<i>Pattern Recognition Receptor</i>)
PSC	Primäre sklerosierende Cholangitis
RAG	<i>Recombination-activating Gene</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPL4	<i>Ribosomal protein L4</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transkription-PCR</i>
SD	Standardabweichung
Sm	<i>Salmonella enterica ssp. enterica ser. typhimurium SL7207</i>
SPF	Spezifisch Pathogen-frei
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>Side Scatter</i>)
TCR	T-Zell Rezeptor (<i>T-cell Receptor</i>)
TGF	<i>Tumor growth factor</i>
T _h	T-Helfer Zelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
T _{Reg}	Regulatorische T-Zelle
U	<i>Unit</i> , Einheit
UC	Kolitis ulzerosa (<i>Ulcerative Colitis</i>)
VAP-1	<i>Vascular Adhesion Protein-1</i>
VCAM	<i>Vascular Adhesion Molecule</i>
VLA-4	<i>Very Late Antigen-4</i>

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die rektale Gabe von Ovalbumin führt zur Aktivierung von OT-I T-Zellen.	26
Abb. 2: Induktion einer Antigen-abhängigen Kolitis.....	28
Abb. 3: Phänotypische Analyse der im GALT aktivierten CD8 OT-I T-Zellen.	32
Abb. 4: OVA-Kolitis führt zur Aktivierung von OT-I T-Zellen in ASBT-OVA Mäusen.	34
Abb. 5: Im Darm aktivierte CD8 T-Zellen lösen eine immunvermittelte Cholangitis aus....	36
Abb. 6: <i>In vitro</i> aktivierte CD8 T-Zellen vermitteln keine immunvermittelte Cholangitis ...	38
Abb. 7: Chronische DSS-Kolitis in ASBT-OVA und Wildtyp-B6 Mäusen.....	40
Abb. 8: Chronische Kolitis führt zu einem pro-inflammatorischen Milieu in der Leber	43
Abb. 9: Chronische Kolitis fördert die Induktion einer immunvermittelten Cholangitis	45
Abb. 10: Aktivierung von CD8 T-Zellen durch endogenes Antigen in Darm und Leber.	48
Abb. 11: Endogenes Antigen in Darm und Leber führt zu immunvermittelter Cholangitis .	50
Abb. 12: Immunhistologie für F4/80, B220, FoxP3 und CK19/CD90.1	52
Abb. 13: Effektorfunktionen nach <i>Salmonella</i> -Infektion	56
Abb. 14: Effektorfunktion nach <i>Salmonella</i> -OVA-Infektion	58
Abb. 15: Histologie nach <i>Salmonella</i> - bzw. <i>Salmonella</i> -OVA-Infektion.....	60
Abb. 16: ALT Werte in ASBT, IFABP, IFABP×ASBT nach <i>Salmonella</i> -Infektion	62
Abb. 17: Phänotyp und Verteilung Dendritischer Zellen nach <i>Salmonella</i> -Infektion	64
Abb. 18: Veranschaulichung des vorgeschlagenen Modells zur PSC-Pathogenese.....	92
Abb. 19: Schematischer Aufbau des ASBT-OVA Konstrukts.....	104
Abb. 20: Schematischer Aufbau des IFABP-OVA Konstrukts	105
Abb. 21: Proliferation OVA-Kolitis: Zellzahl und Phänotyp.....	128
Abb. 22: OVA-Kolitis Behandlung durch anti-Integrin $\alpha 4$	130
Abb. 23: Histologie des Dünndarms nach <i>Salmonella</i> -Infektion.....	130

1. Einleitung

1.1 Angeborene und adaptive Immunabwehr

Mit der Nahrung gelangen eine Vielzahl von potentiell pathogenen Bakterien, Toxinen, Parasiten und Viren in den Körper. Bei der Vielzahl von Nahrungsbestandteilen und der komplexen Mikroflora, denen der Darm ständig ausgesetzt ist, benötigt der Organismus ein effektives Immunsystem, um sich gegen Invasion, Gewebsschädigung oder systemische Infektion zu schützen. Dabei müssen die vielfältigen Nahrungsantigene toleriert, und es muss zwischen pathogenen und apathogenen Mikroorganismen unterschieden werden, um eine schädliche, überschießende Immunreaktion zu vermeiden.

Die Erhaltung der Integrität der Schleimhäute erfordert das Zusammenwirken der angeborenen und der adaptiven Immunität. Die sofort einsetzenden Reaktionen der phylogenetisch älteren, angeborenen Immunität umfassen Mechanismen wie Opsonisierung, Aktivierung von Komplement- und Koagulationskaskaden, Phagozytose, die Auslösung von pro-inflammatorischen Signalwegen und die Induktion von Apoptose. Das adaptive Immunsystem beruht auf der klonalen Selektion und Expansion von B- und T-Zellen, deren zufällig durch somatische Rekombination generierte Rezeptoren ein bestimmtes auf *Major Histocompatibility Complex* (MHC)-Molekülen präsentiertes Antigen spezifisch erkennen. Dies erlaubt die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, beinhaltet allerdings eine mehrtägige Verzögerung, bis genügend Effektorzellen entstanden sind, um wirksam zur Immunabwehr beizutragen (Janssens und Beyaert, 2003).

Sowohl für die angeborene Immunität als auch das adaptive Immunsystem sind Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern Recognition Receptors*: PRR), wie Toll-*like*-Rezeptoren (TLR) und Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomänen (NOD)-*like*-Rezeptoren (NLR), von entscheidender Bedeutung. Sie erkennen konservierte mikrobielle und virale Strukturen, aber auch bei Gewebserstörung freigesetzte körpereigene Signalmoleküle. Diese so genannten Pathogen-assoziierten molekularen Muster (*Pathogen Associated Molecular Pattern*: PAMP) bzw. Gefahren-assoziierten molekularen Muster (*Danger Associated Molecular Pattern*: DAMP) aktivieren

Effektorzellen der angeborenen Immunität wie Neutrophile, Granulozyten, natürliche Killer (*Natural Killer*: NK)-Zellen, aber auch professionelle antigenpräsentierende Zellen (*Antigen Presenting Cells*: APC) wie Makrophagen und dendritische Zellen (*Dendritic Cells*: DC), die Mikroorganismen phagozytieren und prozessieren können (Medzhitov, 2007).

1.1.1 Antigenpräsentation

Antigenpräsentierende Zellen, insbesondere DC spielen eine Schlüsselrolle dabei, die angeborene Immunität mit der adaptiven Immunabwehr zu verknüpfen. Sie exprimieren ein breites Repertoire von PRR, deren Signale zu einer weitreichenden phänotypischen und funktionellen Veränderung der aktivierten DC führen. Aktivierte APC initiieren die nachhaltige Expansion und Differenzierung Antigen-spezifischer T-Zellen zu dem Stimulus angepassten Effektorzellen. Durch PAMP/DAMP-Kontakt aktivierte DC zeigen eine verringerte phagozytische Kapazität, gleichzeitig steigt die Expression von MHC-Molekülen, auf denen Peptide des prozessierten Mikroorganismus präsentiert werden (Joffre *et al.*, 2009).

MHC-Moleküle werden in MHC-I und MHC-II sowie nichtklassische MHC-I Moleküle eingeteilt, auf denen Peptide intra- bzw. extrazellulärer Herkunft CD8, CD4 oder NKT-Zellen präsentiert werden. Während MHC-I Moleküle auf allen zellkernhaltigen Zellen vorkommen, werden MHC-II Moleküle konstitutiv vor allem auf professionellen APC, wie DC, Makrophagen und B-Zellen exprimiert und sind durch pro-inflammatorische Zytokine auch auf nicht-professionellen APC, wie Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen induzierbar (Neefjes *et al.*, 2011).

Für die Präsentation an CD8 T-Zellen werden intrazelluläre Proteine durch das Proteasom degradiert und im endoplasmatischen Retikulum auf MHC-I Moleküle geladen, aber auch extrazelluläre Proteine können auf MHC-I Molekülen kreuzpräsentiert werden. Dafür gibt es entsprechend der Art des extrazellulären Antigens verschiedene Wege. So werden partikuläre Antigene aus dem frühen Phagosom auf MHC-I Moleküle geladen und lösliche Antigene durch spezifische Rezeptoren vermittelt endozytiert und aus dem frühen Endosom in den MHC-I Präsentationsweg geschleust. Die Kreuzpräsentation extrazellulärer Antigene ist für die

Erkennung viraler Infektionen, bei denen DC nicht selbst infiziert sind sowie bei der Immunantwort gegen Tumorantigene und der Induktion peripherer Kreuztoleranz von großer Bedeutung (Neeffjes *et al.*, 2011).

Extrazelluläre Proteine werden jedoch insbesondere über MHC-II an CD4 T-Zellen präsentiert. Die extrazellulären Antigene gelangen dabei wie oben beschrieben in die Zelle, werden jedoch anders prozessiert. Partikuläre extrazelluläre Antigene werden aus dem späten Phagosom auf MHC-II Moleküle geladen, während lösliche extrazelluläre Proteine durch Rezeptor-vermittelte Endozytose oder Pinozytose aufgenommen und nach lysosomaler Prozessierung auf MHC-II Moleküle geladen werden (Burgdorf und Kurts, 2008; Neeffjes *et al.*, 2011).

1.1.2 T-Zell-Aktivierung

Für die vollständige Aktivierung von T-Zellen bedarf es mehrerer Signale. Das notwendige erste Signal zur Aktivierung einer naiven T-Zelle ist die Erkennung des auf MHC-Molekülen präsentierten spezifischen Antigens durch den T-Zell-Rezeptor (TCR). Für die Proliferation, Differenzierung und das Überleben der T-Zelle bedarf es weiterer wichtiger Signale. Das zweite Signal wird von aktivierten DC durch die verstärkte Expression co-stimulatorischer Moleküle, wie CD40, CD80 und CD86 vermittelt, die auf der Seite der T-Zelle mit CD154 und CD28 interagieren und auch auf die DC zurückwirken. Als drittes Signal bestimmen von DC sezernierte Zytokine und die Expression von Notch-Liganden die Differenzierung der T-Zelle (Amsen *et al.*, 2004). So ist Interleukin-12 (IL-12) ein wichtiger Mediator für die Initiation einer T-Helfer (T_H)₁ dominierten Immunantwort und die Entwicklung zytotoxischer T-Zellen, während die Sekretion von IL-4 und IL-10 eine Differenzierung Richtung T_H ₂ und IL-6 und IL-23 in Richtung T_H ₁₇ bewirken. Regulatorische T-Zellen werden insbesondere durch *Tumor Growth Factor* (TGF)- β induziert. Die Integration dieser 3 Signale durch die T-Zelle bestimmt maßgeblich ihre vollständige Differenzierung zu einer Effektorzelle, fehlen die Signale 2 oder 3 führt das zu einem inaktiven Zustand, wie Anergie und Deletion oder einem regulatorischem Phänotyp (Hivroz *et al.*, 2012).

Die Reifung Dendritischer Zellen kann nicht nur über direkten PAMP/DAMP-Kontakt ausgelöst werden, sondern auch indirekt durch *Tumor Nekrose Faktor*

(TNF)- α und Typ-I Interferone (IFN- α/β). Diese trans-aktivierten DC weisen ebenfalls eine erhöhte Expression von MHC-II und co-stimulatorischen Molekülen auf, die von ihnen aktivierten CD4 T-Zellen sind jedoch wegen eines unvollständigen Signals 3 in der Effektorfunktion überwiegend eingeschränkt (Joffre *et al.*, 2009; Sporri und Reis e Sousa, 2005). Auch für CD8 T-Zellen wird eine unvollständige Aktivierung und fehlende Effektorfunktionen beschrieben (Albert *et al.*, 2001; Curtsinger *et al.*, 2003), es gibt jedoch auch Hinweise, dass trans-aktivierte DC ohne CD4 T-Zell-Hilfe erfolgreich die Differenzierung von CD8 T-Zellen zu zytotoxischen Effektorzellen induzieren können (Kleindienst *et al.*, 2005; Le Bon *et al.*, 2003). Die Rolle der Transaktivierung bzw. des Reifungszustands von DC für die Vermittlung von Immunität oder Toleranz ist also noch unklar.

1.1.3 T-Zell-Differenzierung

Die oben genannten verschiedenen Gruppen von T-Helfer-Zellen weisen unterschiedliche Profile sezernierter Zytokine und Effektorfunktionen auf. T_h1-Zellen produzieren IFN- γ und TNF- α und vermitteln eine zelluläre Immunantwort zytotoxischer CD8 T-Zellen gegen intrazelluläre Infektionen und Tumorzellen, aber auch autoimmune Erkrankungen (Walsh und Mills, 2013). T_h2-Zellen produzieren IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13, vermitteln eine humorale Immunantwort gegen extrazelluläre Infektionen und sind mit allergischen Reaktionen assoziiert (Walsh und Mills, 2013). T_h17-Zellen produzieren IL-17A, IL-21 und IL-22, sind an einer Immunantwort gegen extrazelluläre Bakterien und Pilze beteiligt und sind an der Entstehung chronischer Entzündungen und autoimmuner Erkrankungen beteiligt (Hammerich *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012). Regulatorische T-Zellen produzieren IL-10 und TGF- β und sind essentiell für die periphere und orale Toleranz und der Beendigung von Immunreaktionen (Wing und Sakaguchi, 2010). Zytotoxische CD8 Effektorzellen produzieren IFN- γ und TNF- α , setzen nach der Erkennung ihres spezifischen Antigens auf MHC-I ohne weitere co-stimulatorische Signale Perforin und Granzyme frei und lösen bei der Zielzelle mittels Fas-Liganden Apoptose aus (Zhang und Bevan, 2011).

1.2 Migration von Lymphozyten

1.2.1 Integrine und Adhäsionsmoleküle

Die funktionelle Spezialisierung aktivierter CD4 und CD8 T-Zellen zeigt sich nicht nur in den genannten Zytokinprofilen, sondern auch in der heterogenen Expression einer Vielzahl von Selektinen, Integrinen und Chemokinrezeptoren, welche die Migration der T-Zellen zu bestimmten Nischen in den lymphatischen Geweben oder in nicht-lymphatische Gewebe zum Ort der Infektion und Entzündungen steuern. Der Austritt aus dem Blutstrom erfolgt über hochendotheliale Venolen (*High Endothelial Venules: HEV*) in einer kontrollierten Mehrschritt-Adhäsionskaskade (*Multistep Adhesion Cascade*). Diese Kaskade beginnt mit dem Selektin-vermittelten Kontakt zu stark glykosylierten Liganden auf der Gefäßwand, wodurch die Zelle gebremst wird und am Endothel entlangrollt. Das langsame Rollen ermöglicht Interaktionen der G-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptoren mit auf dem Endothel immobilisierten Chemokinen, welche die Zelle aktivieren und für eine Konformationsänderung der Integrine mit einer höheren Affinität sorgen. Dadurch binden die Integrine der T-Zellen an vaskuläre Zelladhäsionsmoleküle, wie *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1), *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* (VCAM-1) und *Mucosal Vascular Addressin Cell Adhesion Molecule-1* (MAdCAM-1), was zur festen Adhäsion führt. Schließlich kriecht die Zelle an der Gefäßwand entlang und transmigriert para- oder transzellulär in das Gewebe bzw. den Lymphknoten (Ley *et al.*, 2007).

Naive T-Zellen zirkulieren durch das Blut und die sekundären lymphatischen Organe, wie Lymphknoten und Milz, wofür vorrangig L-Selektin (CD62L), der Chemokinrezeptor CCR7 und das Integrin $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ (*Lymphocyte Function-associated Antigen: LFA-1*) benötigt werden. Nach der Antigen-spezifischen Aktivierung der T-Zelle durch DC, werden diese herunterreguliert und eine selektive Kombination von Integrinen und Chemokinrezeptoren heraufreguliert, welche die T-Zelle an ihren Bestimmungsort leitet. Die Lokalisation und die Art der Infektion bzw. der Entzündung werden dabei von der DC durch die Stärke des TCR-Signals, die Co-Stimulation, die sezernierten Zytokine und Faktoren des umgebenden Stromagewebes an die T-Zellen übertragen (Baaten *et al.*, 2013). Die für CD8 T-Zellen beschriebenen Adhäsionsmoleküle und ihre Liganden sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Adhäsionsmoleküle muriner CD8 T-Zellen nach (Brinkman *et al.*, 2013)

Adhäsionsmolekül	Expression	Primärer Ligand	Ligand-Expression
Integrin $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4)	niedrig auf naiven, heraufreguliert auf aktivierten T-Zellen	VCAM-1	Knochenmark, HEV, erhöht in Darm, Lunge und Leber bei Entzündung
Integrin $\alpha 4\beta 7$	niedrig auf naiven, heraufreguliert nach Aktivierung	MAdCAM-1	mLN, HEV der Peyerschen Plaques und des Dünndarms
Integrin $\alpha E\beta 7$ (CD103)	nicht auf naiven, heraufreguliert auf T-Zell-Subtypen	E-Cadherin	Epithelien
Integrin $\alpha L\beta 2$ (LFA-1)	konstitutiv auf naiven und aktivierten T-Zellen	ICAM-1	Postkapilläre Venen, erhöht bei Entzündung
CD44	niedrig auf naiven, heraufreguliert auf aktivierten T-Zellen	Hyaluronsäure	Bindegewebe, Endothel, Gehirn, erhöht bei Gewebeschäden
E-Selektin-Ligand	nicht auf naiven, heraufreguliert auf aktivierten T-Zellen	E-Selektin	niedrig auf HEV der Haut, erhöht bei Entzündung
L-Selektin (CD62L)	hoch auf naiven und Gedächtniszelltypen herunterreguliert auf aktivierten T-Zellen	PNAd	HEV der Lymphknoten, erhöht auf entzündetem nicht-HEV Blutendothel
P-Selektin-Ligand	niedrig auf naiven, heraufreguliert auf aktivierten T-Zellen	P-Selektin	niedrig auf HEV der Haut, erhöht bei Entzündung

Abkürzungen: HEV, hochendotheliale Venolen; ICAM-1, *Intercellular Adhesion Molecule-1*; LFA-1, *Leukocyte Function-associated Antigen-1*; MAdCAM-1, *Mucosal Vascular Addressin Cell Adhesion Molecule-1*; mLN, mesenteriale Lymphknoten; PNAd, *Peripheral Node Addressins*; VCAM-1, *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*; VLA-4, *Very Late Antigen-4*

Aktivierte CD8 T-Zellen können eine Vielzahl an Chemokinrezeptoren exprimieren, die darüber hinaus überlappende Spezifitäten für mehrere Chemokine aufweisen. Dazu gehören CXCR3 (*Chemokine (C-X-C motif) Receptor: CXCR*), CXCR4, CXCR6 und CCR1-10 (*Chemokine (C-C motif) Receptor: CCR*) (Brinkman *et al.*, 2013), wobei für in den mesenterialen Lymphknoten (*mesenteric Lymph Nodes: mLN*) aktivierte CD4 T-Zellen gegenüber peripher aktivierten insbesondere eine erhöhte Expression von CXCR3, CXCR6, CCR5, CCR6 und CCR9 gezeigt wurde (Stenstad *et al.*, 2006). Für die Migration von aktivierten T-Zellen in den Darm ist die Expression des Integrins $\alpha 4\beta 7$, welches an das exklusiv in den HEV des Darm-assoziierten lymphatischen Gewebes (*Gut Associated Lymphoid Tissue: GALT*) exprimierte MAdCAM-1 bindet und

die Expression von CCR9, dessen Ligand CCL25 (*Chemokine (C-C motif) Ligand 25*) insbesondere im Dünndarm exprimiert wird, von großer Bedeutung (Kunkel *et al.*, 2000; Papadakis *et al.*, 2001). Da CCL25 nicht im Kolon exprimiert wird (Stenstad *et al.*, 2007), sind hier statt CCR9 andere Chemokinrezeptoren wie CCR6 an der Migration von T-Zellen beteiligt (Kwon *et al.*, 2002; Teramoto *et al.*, 2005).

1.3 Immunologie des Darms

1.3.1 Physiologisches Gleichgewicht

Um den Körper vor der Vielzahl von potentiell pathogenen Bakterien, Toxinen, Parasiten und Viren zu schützen, verfügt der Verdauungstrakt über eine Reihe von Abwehrmechanismen. Die wichtigste Barriere stellt die Schleimhaut dar, deren Schleim zahlreiche für Mikroorganismen hochaffine Oligosaccharide, Immunglobuline (IgA, IgM) und Defensine enthält, die Pathogene an der Interaktion mit Epithelzellen hindern und lysieren (Gallo und Hooper, 2012). Gleichzeitig entsteht eine Nische für die kommensale Flora, welche die Ansiedlung und Vermehrung von Pathogenen durch Konkurrenz um Rezeptoren und Nährstoffe erschwert (Moncada *et al.*, 2003), aber auch direkt durch Zellkontakt oder Metaboliten, wie kurzkettige Fettsäuren, das mukosale Immunsystem beeinflusst (Arpaia *et al.*, 2013; Cording *et al.*, 2013). Die eng durch *Tight-Junctions* verbundenen Epithelzellen der Schleimhaut bilden nicht nur die wichtige physikalische Barriere zum Darmlumen, neben der selektiven Aufnahme verdauter Nährstoffe und der Regulation der Flüssigkeits- und ElektrolytabSORption und Sekretion sind sie ein aktiver Teil des mukosalen Immunsystems. So fungieren Epithelzellen als nicht-professionelle APC, die ohne entsprechende Co-Stimulation bei interagierenden CD4 T-Zellen Toleranz vermitteln. Gleichzeitig exprimieren sie basolateral bzw. intrazellulär PRR wie TLR und NLR, womit sie auf die kommensale Flora reagieren und bei Zellschädigung oder dem Eindringen von Pathogenen die angeborene Immunabwehr aktivieren können. Unter normalen Umständen dominieren Moleküle, die regulatorische oder T_H2-Antworten fördern. Als Reaktion auf eine Schädigung lenken die dann sezernierten Zytokine und Chemokine, wie TNF- α , IL-6, IFN- γ und CCL20 Neutrophile, Makrophagen und DC zum Ort der Entzündung und bestimmen die Art der Immunantwort. Zusätzlich zur direkten anti-mikrobiellen Aktivität der immigrierten

Lymphozyten, nehmen die lokal aktivierten professionellen APC Antigene auf, prozessieren und transportieren sie über die Lymphbahnen zu den drainierenden mLN, wo das adaptive Immunsystem instruiert wird (Trivedi und Adams, 2013).

Unter normalen Bedingungen migrieren myeloide DC (mDC) stetig vom Darm zu den mesenterialen Lymphknoten. Diese DC nehmen auch apoptotische Enterozyten auf, wobei sie ohne eine Entzündung nicht vollständig aktiviert werden und keine Effektor-Reaktionen induzieren, sondern die Toleranz gegenüber endogenen Antigenen aufrechterhalten (Huang *et al.*, 2000). Eine Verletzung oder Infektion führt zur Freisetzung von PAMPs/DAMPs und Entzündungsmediatoren, welche die Reifung, Antigenaufnahme und -präsentation von mDC beeinflussen und eine erhöhte Migration vom Gewebe in die Lymphknoten bewirken. Diese DC sind vollständig aktiviert und induzieren eine dem aktivierenden Stimulus angepasste Immunantwort (Reis e Sousa, 2006). Im Gegensatz dazu migrieren plasmazytoide DC (pDC) nicht zwischen Darm und den drainierenden Lymphknoten, sondern sezernieren im entzündeten Gewebe vor allem Typ-I Interferone und fördern die lokale Differenzierung FoxP3⁺ regulatorischer T-Zellen (T_{reg}), die zusammen mit anderen Zellen Immunreaktionen im Darm kontrollieren und die Toleranz gegenüber Nahrungsantigenen, körpereigenen und kommensalen Antigenen erhalten (Yrlid *et al.*, 2006).

Die Route, über die Antigene aus dem Lumen aufgenommen werden, ist für die Suppression oder Auslösung einer Immunreaktion von großer Bedeutung. Vor allem lösliche Antigene werden über Epithelzellen oder intraepitheliale Makrophagen aufgenommen und über Exosomen oder in direktem Zellkontakt durch *Gap-Junctions* an CD103⁺ DC weitergeleitet (Mazzini *et al.*, 2014). Diese DC reifen, migrieren über die Lymphbahnen zu den mLN und induzieren dort unterstützt durch mesenteriale Stromazellen mittels Retinolsäure und TGF- β bevorzugt FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen (Cording *et al.*, 2013). Retinolsäure ist dabei für das Einprägen der für die Migration in den Darm wichtigen Moleküle $\alpha 4\beta 7$ und CCR9 auf T-Zellen essentiell (Iwata *et al.*, 2004), wobei die für die Umwandlung von Retinol (Vitamin A) in Retinolsäure notwendigen Enzyme spezifisch in DC aus dem Darm exprimiert werden (Eksteen *et al.*, 2009). Die induzierten T_{reg} migrieren zurück in den Darm, expandieren lokal in der IL-10-reichen Lamina propria und vermitteln orale Toleranz sowohl im Darm als auch

systemisch (Pabst und Mowat, 2012). Dagegen werden partikuläre Antigene überwiegend über spezialisierte Mikrofolten-Zellen (M-Zellen) aufgenommen und professionellen APC in den Peyerschen Plaques vermittelt, wo eine angepasste Immunantwort initiiert wird (Shao *et al.*, 2001).

Durch den Transport von Nährstoffen und der möglichen Translokation von Pathogenen über die Portalvene in die Leber, ist dort ein zweites Schutzsystem erforderlich, um auf Antigene, die dem mukosalen Immunsystem entgehen, zu reagieren. So ist die Leber wichtig für die Aufrechterhaltung der oralen Toleranz gegenüber Nahrungsantigenen, aber auch für Immunreaktionen gegen Pathogene, welche die Leber direkt über den Blutkreislauf oder über die Gallengänge erreichen können (Pabst und Mowat, 2012).

1.3.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Das GALT beherbergt den größten Anteil der Lymphozyten des Körpers, die in einem komplexen Gleichgewicht miteinander interagieren (Guy-Grand und Vassalli, 1993). Bei einer genetischen Prädisposition, in der die Bakterienerkennung, die Autophagie, die epitheliale Barrierefunktion, die Differenzierung und Funktion von T-Zellen oder die Bewältigung von endoplasmatischem Retikulum Stress und oxidativen Stress beeinträchtigt werden, kann es zu Störungen der Epithel- oder Immunhomöostase und zu rezidivierenden oder chronischen Entzündungen des Darms kommen (Abdullah *et al.*, 2013). Dabei verändert sich die Zusammensetzung der kommensalen Flora (Dysbiose), die dann entzündungsfördernd wirkt (Strober, 2013). So sind insbesondere die bakterienreichen Abschnitte des Darms von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) betroffen - bei Morbus Crohn vor allem das terminale Ileum und das Kolon, bei Kolitis ulcerosa (*Ulcerative Colitis*: UC) nur das Kolon. Es kommt zu einer Immunreaktion gegen Teile der bakteriellen Flora und gegen Autoantigene, die bei Morbus Crohn zu einer diskontinuierlichen, segmentalen, transmuralen Entzündung und bei Kolitis ulcerosa zu einer kontinuierlichen Entzündung vom Rektum bis zu proximalen Kolonabschnitten führt. Beide Erkrankungen gehen mit Durchfall, Schmerzen, Fieber und Gewichtsabnahme bis hin zu *Fatigue* einher und werden mit immunsuppressiven Medikamenten oder mit Antikörpern gegen Zytokine bzw.

Migrations-vermittelnde Moleküle behandelt (Neurath, 2014). Auch Infektionen mit *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*, *Clostridium difficile*, *Campylobacter sp.*, *Salmonella sp.* und einige Viren sind eng mit CED assoziiert und können die Entstehung und Erhaltung der chronischen Entzündung begünstigen und verstärken (Mann und Saeed, 2012). In den HEV des Darms kommt es durch die ausgeschütteten pro-inflammatorischen Zytokine zu einer erhöhten Expression der Adhäsionsmoleküle MAdCAM-1, VCAM-1 und ICAM-1, was die verstärkte Einwanderung von Lymphozyten begünstigt und bei einer Blockade durch Antikörper zur Verringerung der Krankheitsaktivität führt (Murphy *et al.*, 2012; Soriano *et al.*, 2000).

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen weisen bei einigen Patienten auch extraintestinale Manifestationen auf, die Gelenke, Haut, Augen und die Leber betreffen können. Während die Erkrankungen der Haut und der Augen parallel zur Entzündungsaktivität im Darm verlaufen, zeigen die chronischen Entzündungen der Leber teilweise eine vom Darm unabhängige Aktivität und können noch auftreten, wenn das entzündete Kolon bereits operativ entfernt wurde. Allen gemeinsam ist die massive Infiltration mit Lymphozyten in den betroffenen Geweben (Adams und Eksteen, 2006).

1.4 Immunologie der Leber

1.4.1 Anatomie

Die Leber besitzt eine duale Blutversorgung, wobei sie den überwiegenden Anteil des Blutstromes über die Portalvene aus dem Darm erhält und ca. 25% aus der Leberarterie stammt. Beide Gefäße verzweigen sich in den Portalfeldern und münden in das Kapillarsystem der Leber, die Sinusoide, wo Nährstoffe ausgetauscht werden. Von dort aus fließt das Blut über die Zentralvene zurück in den systemischen Kreislauf. Dabei ermöglicht der langsame Blutfluss in den engen Kapillaren einen Selektiv-unabhängigen Kontakt von Lymphozyten mit den sinusoidalen Endothelzellen der Leber (LSEC) und regulierte Fenestrationsen im Endothel erlauben direkte Interaktionen mit den lokalen Makrophagen (Kupffer-Zellen), DC, Ito-Zellen und Hepatozyten (Thomson und Knolle, 2010).

1.4.2 Toleranz

Wie der Darm muss die Leber die konkurrierenden Anforderungen nach Toleranz gegenüber Nahrungsantigenen und mikrobiellen Bestandteilen und der Immunabwehr von Pathogenen gleichermaßen erfüllen. So führt das durch hepatische Stromazellen bestimmte lokale Mikromilieu zur Differenzierung von Monozyten zu tolerogenen DC, die wenig MHC-II, co-stimulatorische Moleküle und kein IL-12 exprimieren, jedoch IL-10, IL-27 und anti-inflammatorische Prostaglandine sezernieren und so die T-Zell-Aktivierung und Proliferation unterdrücken bzw. die Polarisation von naiven T-Zellen zu T_H2 und T_{reg} induzieren (Cabillic *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2009; Rutella *et al.*, 2006). Neben DC sind in der Leber vor allem LSEC und Kupffer-Zellen als APC aktiv und maßgeblich an der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts von Toleranz und Immunität beteiligt.

Die in der Leber lokalisierten Kupffer-Zellen sind vor allem auf die Phagozytose und Beseitigung partikulärer, mikrobieller Antigene sowie apoptotischer Zellen spezialisiert, während LSEC vor allem kleinere Nahrungs- und bakterielle Bestandteile aus dem portalvenösen Blut aufnehmen, um sie an die Hepatozyten weiterzugeben bzw. zu beseitigen. Dazu exprimieren Kupffer-Zellen und LSEC eine Reihe von Mannose-, Scavenger- und Fc-Rezeptoren. Entsprechend der kontinuierlichen Exposition mit mikrobiellen Bestandteilen zeigen sie eine erhöhte Toleranz gegenüber TLR-Liganden, einerseits vermittelt durch intrinsische Mechanismen der PRR-Signalwege, andererseits auch durch die IL-10 reiche Umgebung (Biswas und Lopez-Collazo, 2009). So reagieren Kupffer-Zellen auf Lipopolysaccharide (LPS) mit der Sekretion von IL-10, TGF- β und Prostaglandinen und tragen unter physiologischen Bedingungen als Hauptquelle dieser anti-inflammatorischen Mediatoren zur Toleranzinduktion in der Leber bei (Knolle *et al.*, 1995; You *et al.*, 2008). Daneben üben LSEC eine besondere Funktion als APC aus, indem sie die vom Darm kommenden löslichen Antigene aufnehmen, prozessieren und durch fehlende co-stimulatorische Signale oder inhibitorische Moleküle wie *Programmed Death-Ligand* (PD-L) 1 in CD4 und CD8 T-Zellen funktionale (Kreuz-) Toleranz vermitteln (Diehl *et al.*, 2008; Katz *et al.*, 2004; Limmer *et al.*, 2005; Schurich *et al.*, 2010). Unter physiologischen Bedingungen führt die Antigenpräsentation von LSEC, Kupffer-Zellen und Hepatozyten zur

Antigen-spezifischen Rekrutierung von CD8 T-Zellen und zur lokalen Toleranzinduktion (Bertolino *et al.*, 2001; Holz *et al.*, 2010b; von Oppen *et al.*, 2009).

1.4.3 Immunität

Zur Elimination von ins Blut gelangten oder hepatotropen Pathogenen muss in der primär tolerogenen Umgebung der Leber eine wirksame Immunabwehr initiiert werden. Die Hyporesponsivität von Kupffer-Zellen kann durch direkten Kontakt mit Pathogenen über intrazelluläre PRR, wie TLR3, TLR7 und TLR9, welche virale und bakterielle Nukleinsäuren erkennen, oder IFN- γ überwunden werden. Die so aktivierten Kupffer-Zellen sezernieren pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine, wie TNF- α , IL-6 und CCL2, CCL5, wodurch Neutrophile und DC aus dem Blut rekrutieren werden. Diese helfen bei der Elimination des Pathogens bzw. können eine adaptive Immunantwort initiieren. Darüber hinaus können Kupffer-Zellen selbst als APC für T-Zellen fungieren und über die Präsentation von Lipidantigenen auf CD1d hepatische NKT-Zellen als potente immun-modulatorische Effektorzellen aktivieren (Crispe *et al.*, 2006; Giannandrea *et al.*, 2009; Matsuno *et al.*, 2002).

Neben ihren primären metabolischen Hauptfunktionen sind Hepatozyten auch für die Produktion vieler Akute-Phase-Proteine und Komponenten des Komplementsystems verantwortlich, welche für die Opsonierung von Pathogenen und für die angeborene Immunabwehr von großer Bedeutung sind (Jenne und Kubes, 2013). Darüber hinaus können Hepatozyten auch direkt naive T-Zellen aktivieren, da sie basolateral zu den Sinusoiden gerichtet MHC-Moleküle und co-stimulatorische Moleküle exprimieren (Wahl *et al.*, 2008; Warren *et al.*, 2006).

Pathogene können nicht nur über das Blut, sondern auch über den Gallengang (*Ductus choledochus*) in die Leber gelangen. Somit bilden die mit Cholangiozyten ausgekleideten Gallengänge eine Fortsetzung der intestinalen Epithelbarriere. Sie haben mit dem Darm einige Barriere-Funktionen gemeinsam, wie die Sekretion von IgA, die Expression von PRR und das Vorkommen lokaler Epithel-assoziiierter Lymphozyten und DC. Als Reaktion auf pro-inflammatorische Zytokine oder TLR-Liganden exprimieren Cholangiozyten Adhäsionsmoleküle und Chemokine, wie CXCL12, CXCL16, CX3CL1

und CCL28, und sind aktiv an der Rekrutierung von Lymphozyten und DC beteiligt (Borchers *et al.*, 2009; Fava *et al.*, 2005).

1.4.4 Migration in die Leber

Die Leber-residenten Zellen beeinflussen die lokale Immunregulation nicht nur durch ihre Funktion als APC, sondern auch durch die spezifische Rekrutierung von bestimmten Lymphozyten-Populationen. Die Migration von Lymphozyten in die Leber erfolgt dabei hauptsächlich über die Portalvenen und die Sinusoide und wird durch die Expression von Adhäsionsmolekülen und der Präsentation von Chemokinen auf den Endothelzellen reguliert. Während in den Portalvenen die Migration über die beschriebene Mehrschritt-Adhäsionskaskade verläuft, entfällt in den engen Sinusoiden das Selektin-abhängige Rollen am Endothel und Lymphozyten können direkt an den Adhäsionsmolekülen haften (Wong *et al.*, 1997). Dabei werden die verschiedenen Lymphozyten-Populationen selektiv über unterschiedliche Adhäsionsmechanismen, die Integrine, Chemokinrezeptoren und auch andere Moleküle nutzen, in das nicht entzündete oder entzündete Kapillarsystem der Leber rekrutiert. So werden zirkulierende DC von Kupffer-Zellen über C-Typ-Lektine aus dem Blut in die hepatischen Sinusoide rekrutiert, wodurch der Pool der residenten DC kontinuierlich erneuert wird und DC in die lymphatische Zirkulation eintreten können (Thomson und Knolle, 2010). Für CD4 T_H1-Zellen ist die Bindung über das Integrin $\alpha 4\beta 1$ an VCAM-1 in den Sinusoiden wichtig, während für CD4 T_H2-Zellen das *Vascular Adhesion Protein* (VAP)-1 überwiegt (Bonder *et al.*, 2005). Aktivierte und naive CD8 T-Zellen migrieren hauptsächlich mittels der Integrine $\alpha L\beta 2$ und $\alpha 4\beta 1$ über die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (Antigen-abhängig) und VCAM-1 (Antigen-unabhängig) in die Leber (Bertolino *et al.*, 2005; John und Crispe, 2004; Mehal *et al.*, 1999). Als Chemokinrezeptoren sind für CD8 T-Zellen CCR5, CCR6, CCR9 und CXCR3, für CD4 T_H1-Zellen CCR5, CXCR3 und CXCR6, und für CD4 T_H2-Zellen CCR4 und CCR8 von großer Bedeutung, deren spezifische Chemokin-Liganden entsprechend der jeweiligen inflammatorischen Bedingungen in der Leber induziert werden können (Guidotti und Iannaccone, 2013; Oo und Adams, 2010).

Unter normalen Bedingungen weisen die portalen Endothelzellen und LSEC eine niedrige basale Expression von ICAM-1 und VCAM-1 auf, welche bei einer Entzündung durch Zytokine, wie TNF- α , IFN- γ und IL-1 β , stark ansteigt. Auch nicht-klassische Adhäsionsmoleküle, wie CD44, sind für die Migration von Lymphozyten in die Leber von großer Bedeutung. CD44 wird u.a. auf Monozyten, Neutrophilen und aktivierten T-Zellen exprimiert und der primäre Ligand Hyaluronan wird auf Leberendothelien durch pro-inflammatorische Zytokine, wie TNF- α , induziert, wodurch mehr Lymphozyten in die Leber einwandern können (McDonald *et al.*, 2008; Nandi *et al.*, 2000). Daneben wird auf den Endothelien der Leber konstitutiv VAP-1 exprimiert, welches die Bindung von Lymphozyten vermittelt und als aktives Enzym primäre Amine deaminiert. Die Aktivierung von VAP-1 auf dem Endothel führt zusätzlich zu einer verstärkten Expression von ICAM-1 und E-Selektin, was die Kapazität zur Rekrutierung von Lymphozyten mit den entsprechenden Liganden erhöht (Borchers *et al.*, 2009; Lee und Kubes, 2008). VAP-1 könnte auch eine Rolle für das Auftreten von extraintestinalen Manifestationen bei CED in der Leber spielen. So führt das in Zusammenhang mit der gestörten intestinalen Barriere vermehrt ins portalvenöse Blut translozierte VAP-1-Substrat Methylamin zusammen mit dem erhöhten TNF- α Spiegel zu einer aberranten Expression des Darm-typischen Adressins MAdCAM-1 in der Leber (Liaskou *et al.*, 2011). Zusammen mit der erhöhten Expression des CCR9 Liganden CCL25 in der entzündeten Leber, ermöglicht dies die Migration von im Darm aktivierten T-Zellen in die Leber, was ein möglicher Mechanismus für die Entstehung der Primären sklerosierenden Cholangitis sein könnte (Eksteen *et al.*, 2004; Grant *et al.*, 2001).

1.5 Primär sklerosierende Cholangitis

1.5.1 Pathologie

Die Primäre sklerosierende Cholangitis (PSC) ist eine chronisch rezidivierende Entzündung der extra- und intrahepatischen Gallengänge bislang unbekannter Ursache, die durch typische Zwiebelschalen-artige, fibrotische Verengungen der Gallengänge eine Cholestase hervorruft und im Verlauf zu Gallengangsatrophy, biliärer Zirrhose, Gallengangskarzinom und Leberversagen führen kann. Dabei ist die PSC bei bis zu 80% der nordeuropäischen Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen,

insbesondere einer (milden) Kolitis assoziiert, während ca. 2-7,5% der Patienten mit Kolitis ulcerosa eine PSC entwickeln. Die Therapie der PSC ist schwierig, da immunsuppressive Medikamente nur geringe Wirkung zeigen. Daher zielt die Behandlung der PSC auf die Verzögerung der fibrotischen Veränderungen und die interventionelle Aufweitung der Cholestase-verursachenden Strikturen ab, im fortgeschrittenen Verlauf wird häufig eine Lebertransplantation als einzige lebensverlängernde Maßnahme notwendig (Worthington und Chapman, 2006). Darüber hinaus haben Patienten mit PSC ein hohes Risiko für maligne Erkrankungen der Gallenwege, der Leber sowie des Darms und der Bauchspeicheldrüse, welche häufig die Todesursache darstellen (Bergquist *et al.*, 2002; Claessen *et al.*, 2009).

1.5.2 Ätiologie

Die enge Assoziation mit dem Vorhandensein einer Kolitis, das Auftreten von Autoantikörpern und genomweite Assoziations-Studien legen nahe, dass die PSC eine multifaktorielle immunvermittelte Erkrankung mit genetischen und äußeren Suszeptibilitätsfaktoren darstellt. So wurden u.a. genetische Varianten, welche die Antigenpräsentation auf MHC-I und MHC-II gegenüber T-Zellen und NK-Zellen betreffen, im *Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor* (KIR) und anderen die NK-Zell-Funktion betreffenden Genen, im TNF- α Promotor, im Chemokinrezeptor CCR5, bei ICAM-1 und bei Genen, welche die Gallensäure- und Cholesterin-Homöostase regulieren, gefunden. Die geringe Überschneidung mit bekannten Suszeptibilitätsgenen von CED weist dabei darauf hin, dass die bei PSC beobachtete Kolitis eine eigene Subgruppe darstellen könnte (Pollheimer *et al.*, 2011a). Gleichzeitig gibt es auch klinische Hinweise auf eine zusammenhängende Pathogenese zwischen Kolitis und PSC. So ist, obwohl die Entzündung in der Leber oft eine von der Kolitis unabhängige Aktivität aufweist, die Abwesenheit einer aktiven Kolitis nach einer notwendigen Lebertransplantation gegen ein Wiederauftreten der PSC von Vorteil, und umgekehrt zeigt die Lebertransplantation einen positiven Einfluss auf die Aktivität der Kolitis (Cholongitas *et al.*, 2008; Jorgensen *et al.*, 2012).

Dies führte zur *Leaky Gut*-Hypothese, wonach die durch eine gestörte Darmbarriere vermehrte Translokation von Bakterien bzw. bakteriellen Bestandteilen in

die Portalvene in der Leber eine entzündliche Reaktion an den Gallengängen induzieren könnte. Die eindringenden Bakterien könnten Kupffer-Zellen und Monozyten zur Sekretion von Zytokinen und Chemokinen stimulieren, was eine Cholangitis auslöst und Wundheilungsprozesse aktiviert, welche zu der charakteristischen konzentrischen periduktulären Fibrose führen (O'Mahony und Vierling, 2006). Die Ergebnisse verschiedener tierexperimenteller Studien, die eine bakterielle Überbesiedlung des Dünndarms, bakterielle Produkte und eine erhöhte intestinale Permeabilität mit PSC-ähnlichen Auswirkungen in der Leber verbanden, unterstützen diese Hypothese (Pollheimer *et al.*, 2011a), und in klinischen Studien konnte ein positiver Effekt einer zusätzlichen Antibiotikabehandlung für PSC-Patienten festgestellt werden (Tabibian *et al.*, 2013). Unklar bleibt dabei, inwieweit eine transiente Translokationen von Bakterien und bakteriellen Bestandteilen, eine CED-assoziierte Dysbiose oder eine durch genetische Prädisposition bestimmte überschießende Immunreaktion der Cholangiozyten die Entzündung erhalten und verstärken.

Nicht alle Symptome der PSC sind jedoch durch die *Leaky Gut*-Hypothese erklärbar, insbesondere der trotz enger Assoziation von PSC und Kolitis voneinander unabhängige Krankheitsverlauf. Nach der alternativen *Gut Lymphocyte Homing*-Hypothese könnten ursprünglich im GALT aktivierte langlebige Gedächtnis-T-Zellen in die Leber migrieren und eine Cholangitis auslösen (Grant *et al.*, 2002). So weisen bei PSC-Patienten ca. 20% der infiltrierenden T-Zellen das Integrin $\alpha 4\beta 7$ und den Chemokinrezeptor CCR9 auf, während auf den Endothelien der entzündeten Leber MAdCAM-1 und CCL25 exprimiert werden (Eksteen *et al.*, 2004; Grant *et al.*, 2001). Darüber hinaus werden auf den portalen und sinusoidalen Endothelzellen bei PSC und Primärer biliärer Zirrhose die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 stark hochreguliert (Borchers *et al.*, 2009). Für die intrahepatische Migration der T-Zellen zu den Gallengängen könnte die erhöhte Expression von VCAM-1 und Chemokinen durch aktivierte Cholangiozyten verantwortlich sein, welche durch PAMPs/DAMPs und pro-inflammatorische Zytokine induzierbar sind (O'Mahony und Vierling, 2006).

Es ist unklar, durch welchen Auslöser die aberrante Expression von MAdCAM-1 und die Aktivierung der Cholangiozyten hervorgerufen wird, da die PSC meist erst in einem relativ fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird. Wenige immunhistologische

Untersuchungen früher PSC-Stadien zeigen diffuse, gemischte Zellinfiltrate aus Lymphozyten, Plasmazellen und Neutrophilen an den Gallengängen. Mit dem Fortschreiten treten die entzündlichen Infiltrate in den Hintergrund, und eine Kombination aus portalen Fibrosen und Ödemen, lokal proliferierenden Cholangiozyten (*Ductular Reaction*) und eine Verringerung der Anzahl der Gallengänge dominieren das Bild. Die initiale Immunreaktion könnte durch eine Infektion oder eine transiente Überschwemmung mit PAMPs/DAMPs ausgelöst werden und bei genetischer Disposition in eine chronische Entzündung übergehen (Pollheimer *et al.*, 2011a). So wurden bei PSC- und UC-Patienten gehäuft Antikörper gegen intrazelluläre Bakterien, wie *Chlamydia sp.* und *Helicobacter sp.* nachgewiesen, die in der Pathogenese eine Rolle spielen könnten (Ljungh und Wadstrom, 2002; Mann und Saeed, 2012; Ponsioen *et al.*, 2002).

1.6 Dysbiose durch Infektion

1.6.1 Kolonisierungsresistenz

Die in einem komplexen dynamischen Gleichgewicht stehende mikrobielle Darmflora hindert Pathogene daran, sich im Darm des Wirtes zu vermehren und anzusiedeln, was als Kolonisierungsresistenz bezeichnet wird. Dabei zeigen Entzündungen des Darms deutliche Auswirkungen auf die Zusammensetzung der Darmflora. So führen chronische Kolitis-Modelle in Mäusen, ausgelöst durch eine Infektion mit *Citrobacter rodentium* oder durch oral appliziertes Natriumdextransulfat (DSS), zu einer drastischen Verschiebung der bakteriellen Dichte der dominanten Bakterienklassen. Während überwiegend anaerobe Bakterienfamilien eliminiert werden, können sich fakultativ aerobe Bakterien, insbesondere Enterobacteriaceae wie *E. coli*, ausbreiten, gegen die vorher eine natürliche Kolonisierungsresistenz bestand (Lupp *et al.*, 2007). Diese Dysbiose der Darmflora in Richtung fakultativ aerober Bakterien wird auch bei Patienten mit CED beobachtet und scheint die Entzündung zu fördern (Manichanh *et al.*, 2012).

1.6.2 *Salmonella typhimurium*

Um die Kolonisierungsresistenz zu überwinden, nutzt auch das entero-pathogene Bakterium *Salmonella enterica spp. enterica* Serovar typhimurium kurz *Salmonella*

typhimurium (Sm) die Entzündungsreaktionen des Wirtes zur Modulation der Darmflora. *Salmonella typhimurium* gehört zur Familie der Enterobacteriaceae und ist ein Gram-negatives, peritrich begeißeltes, stäbchenförmiges, fakultativ anaerobes Bakterium, das nach oraler Infektion über die M-Zellen in die Peyerschen Plaques eindringt und vor allem Makrophagen und DC infiziert. Daneben können auch Enterozyten direkt infiziert werden (Raupach und Kaufmann, 2001). Die Invasion der Mukosa wird durch TLR und NLR detektiert, wodurch die NLRC4- und NLRP3-Inflammasomen in den infizierten Zellen aktiviert und CXC-Chemokine sowie pro-inflammatorische Zytokine, wie IL-1 β , IL-18, IL-12 und IL-23 freigesetzt werden. Diese aktivieren NK-Zellen, rekrutierte Neutrophile und Makrophagen und induzieren die Differenzierung von T_h1/T_h17 CD4 T-Zellen und CD8 Effektorzellen, welche bakterizide Stickoxid- und Sauerstoff-Radikale produzieren sowie weitere Zytokine wie IFN- γ , TNF- α , IL-17 und IL-22 sezernieren (Broz *et al.*, 2012). Die Enterozyten reagieren darauf mit der verstärkten Expression von antimikrobiellen Peptiden, welche mit einem veränderten luminalen Redoxpotenzial einen dominanten Anstieg der Enterobacteriaceae-Population bewirken, in der sich *Salmonella typhimurium* mit spezifischen Anpassungen an die Wirtsabwehr eine Nische schafft. Avirulente Mutanten, die keine Entzündung induzieren können, werden hingegen rasch von der normalen Darmflora verdrängt (Behnsen *et al.*, 2014; Santos, 2014; Stecher *et al.*, 2007). Die zur Bekämpfung des Pathogenes notwendigen Entzündungsreaktionen führen durch eine erhöhte Apoptose (Pyroptose) von Enterozyten auch zu einer Gewebsschädigung, wodurch die intestinale Barriere während der Regenerationsprozesse zusätzlich gestört wird (Broz *et al.*, 2012).

Insgesamt könnte die Infektion also die Entstehung von Autoimmunität begünstigen: durch den erhöhten Epithelzellumsatz gelangen vermehrt Autoantigene der absterbenden Zellen in die Präsentationsmaschine der APC, wobei die (infizierten) APC gleichzeitig durch eine Vielzahl von endogenen DAMPs und exogenen mikrobiellen PAMPs potente Reifungssignale erhalten und Effektorzellen lokal ein pro-inflammatorisches Zytokinmilieu erzeugen. Diese drei essentiellen Signale könnten die Differenzierung autoimmun (kreuz-) reagierender T-Zellen zu Effektor- und langlebigen Gedächtniszellen induzieren, wie sie für die Entstehung der PSC in der *Gut Lymphocyte Homing*-Hypothese postuliert werden.

1.7 Mausmodelle

1.7.1 Cholangitis-Modelle

Das Fehlen effektiver medikamentöser Therapiemöglichkeiten der PSC ist auch ein Ausdruck des noch immer begrenzten Verständnisses der Pathogenese. Daher sind neue Tiermodelle für die Evaluation von Modellen der Pathogenese und für die Entwicklung neuer Therapieoptionen von großer Bedeutung. Die bisherigen Tiermodelle bilden jeweils unterschiedliche mögliche Pathogenitätsfaktoren ab, wie eine toxisch wirkende (veränderte) Gallenflüssigkeit, eine dysfunktionale T-Zellantwort auf einen exogenen Auslöser, eine gesteigerte intestinale Permeabilität oder eine direkte Zellschädigung der Cholangiozyten. Die primäre Schädigung der Cholangiozyten kann chemisch, durch Infektion, durch *Knockout* einzelner protektiver Faktoren, durch bakterielle Bestandteile der Darmflora bzw. Kolitis oder durch ischämische Schäden des Gallengangsepithels bzw. des Leberendothels ausgelöst werden, die sekundäre *Ductular Reaction* der aktivierten Cholangiozyten führt dann bei genetischer Prädisposition zu einer chronischen Entzündung (Pollheimer *et al.*, 2011f).

Zur Immunbiologie von Cholangitiden sind Studien mit IL-2-Rezeptor- α -*Knockout*-Mäusen oder mit dominant negativen TGF- β II-Rezeptor transgenen Mäusen hervorzuheben, die zeigen, dass insbesondere CD8 T-Zellen in diesen Modellen mit einer gestörten T-Zell-Regulation für die Induktion einer Cholangitis von Bedeutung sind (Hsu *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2008). In diesen Modellen dominieren unterschiedliche Zytokine bzw. T-Zellen die Entstehung von Kolitis und Cholangitis. Während die spontan auftretende Kolitis hauptsächlich durch IL-6 und IL-23 induzierte CD4 T_H17-Zellen ausgelöst wird, fördern IL-12 induzierte T_H1 Zytokine die Cholangitis (Ando *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2010).

Ein Antigen-spezifisches Cholangitis-Modell sind die OVA-Bil Mäuse, welche parallel zu den in unserer Arbeitsgruppe entwickelten ASBT-OVA Mäusen entstanden (Buxbaum *et al.*, 2006; Derkow *et al.*, 2007). Durch den Co-Transfer von OVA-spezifischen CD4 ($4 \cdot 10^6$ OT-II) und CD8 ($10 \cdot 10^6$ OT-I) T-Zellen wird in OVA-Bil Mäusen eine transiente Cholangitis ausgelöst, die bei einem Transfer von $5 \cdot 10^6$ OT-I T-Zellen deutlich schwächer ausfällt. Wie in ASBT-OVA Mäusen ist die ausgelöste

Cholangitis jedoch nicht chronisch, es entstehen keine fibrotischen Veränderungen und die Cholangitis ist nicht mit einer Kolitis assoziiert. Trotzdem sind diese Modelle für die Untersuchung der frühen immunvermittelten Prozesse in der Pathogenese von Cholangitiden von großem Wert.

In den bisherigen Modellen werden die in Abschnitt 1.5.2 in der *Gut Lymphocyte Homing*-Hypothese zusammengefassten Befunde von PSC-Patienten, die zeigen, dass im GALT aktivierte T-Zellen in den periportalen Infiltraten vermehrt vorkommen, nicht abgebildet. So ist insbesondere die Rolle der enterohepatischen Migration von im Darm aktivierten T-Zellen noch unklar.

1.7.2 Kolitis-Modelle

Kolitiden können bei einer genetischen Prädisposition durch Störungen der Epithel- oder Immunhomöostase entstehen, die meist durch Bestandteile der intestinalen Flora gefördert werden. Die vielfältigen Tiermodelle bilden dabei entsprechend der klinischen Heterogenität von CED folgende Aspekte ab: Schäden der Epithel-Integrität und – Permeabilität, Mängel in Zellen des angeborenen Immunsystems oder Fehler in Zellen des adaptiven Immunsystems. In den meisten Modellen wird die Entzündung des Darms chemisch, durch eine Infektion mit einem Enteropathogen, durch Immunzell-Transfer oder durch Gen-Targeting ausgelöst und tritt selten spontan auf (Wirtz und Neurath, 2007).

Eine akute sowie chronische Kolitis kann in Mäusen durch die repetitive Gabe von polymerem Natriumdextransulphat (DSS) im Trinkwasser chemisch induziert werden (Okayasu *et al.*, 1990). Dabei komplexiert das Polymer im Kolon mit mittelkettigen Fettsäuren und wirkt durch die Fusion dieser Mizellen mit der Zellmembran direkt toxisch auf die Enterozyten der Basalkrypten, wodurch die intestinale Barriere geschädigt wird (Laroui *et al.*, 2012). Die akute Phase ist von T- und B-Zellen unabhängig und wird überwiegend durch Zellen des angeborenen Immunsystems bestimmt, welche mittels PRR das Eindringen der intestinalen Flora begrenzen (Wirtz *et al.*, 2007).

Der Einfluss einer chemisch induzierten Kolitis auf die Entstehung einer Cholangitis ist bisher wenig untersucht. In einer Studie zeigten nach einer vier-wöchigen akuten

DSS-Kolitis ca. ein Drittel der Mäuse ein mononukleäres Infiltrat an den Gallengängen und einen Anstieg von T_h1 CD4 T-Zellen in der Leber (Numata *et al.*, 2004). Für die häufige klinische Assoziation von PSC mit chronischer Kolitis existiert bisher jedoch noch kein Tiermodell.

1.7.3 Infektionsmodell

Die initiale Störung der Immunhomöostase könnte auch durch eine transiente Infektion und der damit einhergehenden Freisetzung von PAMPs und DAMPs ausgelöst werden. Daher wird als gut definiertes Modell für ein intrazellulär replizierendes, enteropathogenes Bakterium ein attenuierter *Salmonella typhimurium* Stamm verwendet, der durch eine Deletion des Gens *AroA* auxotroph für aromatische Aminosäuren ist. Da die benötigten Aminosäuren im Wirt nicht frei vorkommen, ist die Virulenz dieses Stammes unter Beibehaltung der Immunogenität stark reduziert. Wegen der beschriebenen Präferenz für Makrophagen und DC wird dieser Stamm häufig als Vektor für DNA-Vakzine verwendet, um durch den starken PAMP/DAMP-Stimulus eine überwiegend T_h1 CD4 und CD8 T-Zell-vermittelte Immunantwort gegen die transferierten Antigene aus Pathogenen oder Tumoren zu induzieren (Darji *et al.*, 1997; Michael *et al.*, 2004). Hier soll eine transiente Infektion dazu benutzt werden, die Reifung von APC zu induzieren und so im Darm transgen exprimierte Selbstantigene in einen inflammatorischen Kontext zu bringen.

2. Fragestellung

Angesichts der engen Integration des mukosalen Immunsystems mit dem der Leber und der gemeinsamen Exposition gegenüber Antigenen aus dem Darmlumen, kann die Leber insbesondere von immunvermittelten Darmerkrankungen beeinflusst werden. So ist das Auftreten einer PSC eng mit einer chronischen Kolitis assoziiert. Patienten mit PSC weisen in den periportalen Infiltraten vermehrt T-Zellen mit einem Phänotyp auf, der auf eine ursprüngliche Aktivierung im GALT hinweist, und exprimieren auf den Endothelien verstärkt die dazu korrespondierenden Zelladhäsionsmoleküle und Chemokine. Dies führte zu der *Gut Lymphocyte Homing*-Hypothese, dass im GALT aktivierte T-Zellen ursächlich an der Pathogenese der PSC beteiligt sein könnten (Grant *et al.*, 2002).

Da die PSC meist erst in einem relativ fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird, ist es unmöglich, die initialen Prozesse am Menschen zu untersuchen. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit die Teilaspekte der Erkrankungssituation beim Menschen mit Hilfe verschiedener Mausmodelle nachgebildet werden. Dazu wurden in der Arbeitsgruppe geschaffene transgene Mäuse verwendet, die das Modellantigen Ovalbumin (OVA) spezifisch in den Cholangiozyten exprimieren. In diesen werden adoptiv transferierte transgene CD8 T-Zellen, welche einen für OVA₂₅₇₋₂₆₄ spezifischen T-Zell-Rezeptor exprimieren, lokal aktiviert, was jedoch nicht zu einer messbaren Entzündung in der Leber führt (Derkow *et al.*, 2007). In diesem Modell kann untersucht werden, welche Faktoren potentiell autoimmune CD8 T-Zellen in die Lage versetzen, eine immunvermittelte Cholangitis auszulösen. Dabei sollte insbesondere die Rolle der enterohepatischen Migration im Darm aktivierter T-Zellen näher charakterisiert werden. Dazu wurden ein neu entwickeltes, Antigen-abhängiges Kolitis-Modell, eine transgene Antigen-Expression in Enterozyten, sowie ein chronisches Kolitis-Modell herangezogen, welche eine lokale Aktivierung von T-Zellen im Darm ermöglichen. Darüber hinaus wurde eine transiente intestinale Infektion dazu benutzt, die Reifung von APC zu induzieren und so im Darm transgen exprimierte Selbstantigene in einen inflammatorischen Kontext zu bringen. Folgende Fragestellungen wurden im Einzelnen untersucht:

Führt die lokale Applikation eines exogenen Antigens in das Kolon zur Aktivierung von CD8 T-Zellen im GALT und zu einer Antigen-abhängigen Kolitis?

Migrieren im GALT aktivierte CD8 T-Zellen in die Leber und können diese dort Antigen-abhängig eine immunvermittelte Cholangitis auslösen?

Welche Auswirkungen hat eine chronische Kolitis auf die Präsentation eines in der Leber transgen exprimierten Selbstantigenes und auf die enterohepatische Migration von im GALT aktivierten T-Zellen?

Ist die gleichzeitige, transgene Expression eines Selbstantigenes im Darm und in der Leber hinreichend, um durch CD8 T-Zellen Antigen-abhängig eine immunvermittelte Cholangitis auszulösen?

Führt die Präsentation eines im Darm transgen exprimierten Selbstantigenes unter den inflammatorischen Bedingungen einer Infektion zu einer veränderten Aktivierung von T-Zellen und bei gleichzeitiger Expression des Selbstantigenes in der Leber zu einer immunvermittelten Cholangitis?

3. Ergebnisse

3.1 Modell einer Antigen-abhängigen Kolitis in Mäusen: OVA-Kolitis

3.1.1 Experimentelles Modell

Um die Hypothese untersuchen zu können, dass im Darm aktivierte T-Zellen an der Entstehung einer immunvermittelten Cholangitis beteiligt sind, musste ein Antigen-abhängiges Kolitis-Modell in Mäusen etabliert werden, das es ermöglicht, eine lokale Aktivierung von CD8 T-Zellen im Kolon und GALT zu erzielen. Dazu wurde zunächst die Darmschleimhaut durch die rektale Gabe von Ethanol gestört. Die vor der bakteriellen Flora schützende Schleimschicht wird dabei vorübergehend soweit reduziert, dass die nachfolgend rektal applizierten Antigene Ovalbumin (OVA) bzw. als Kontrolle Rinderserumalbumin (*Bovine Serum Albumin*: BSA) in direkten Kontakt mit der Epithelzellschicht treten können. Zum gleichen Zeitpunkt wurden naive OT-I CD8 T-Zellen intravenös injiziert. Diese OT-I T-Zellen exprimieren einen transgenen T-Zellrezeptor, welcher im Kontext des MHC-I Allels H-2K^b für das von Ovalbumin abgeleitete Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ spezifisch ist (Clarke *et al.*, 2000).

3.1.2 Proliferation

Zunächst wurde untersucht, ob die adoptiv transferierten naiven OT-I CD8 T-Zellen durch das rektal applizierte Antigen *in vivo* aktiviert wurden. Als erstes Zeichen der T-Zellaktivierung wurde nach 48 Stunden die Proliferation der transferierten OT-I T-Zellen überprüft. Dazu waren die OT-I T-Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Carboxyfluorescein-succinimidylester (CFSE) markiert, der bei einer Zellteilung gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt wird. Die damit verbundene Verringerung des Farbstoffgehalts pro Zelle geht mit einer entsprechenden Verringerung der Fluoreszenzintensität einher und wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Bei OT-I T-Zellen aus OVA-behandelten Mäusen zeigte sich das für Proliferation charakteristische Fluoreszenzprofil mit einer mehrgipfligen Verteilung, während bei OT-I T-Zellen aus BSA-behandelten Mäusen ein einzelner Gipfel mit hoher Fluoreszenzintensität detektiert wurde (Abb. 1A). Die transferierten OT-I T-Zellen wurden demnach *in vivo* aktiviert und proliferierten in den mLN, in der Milz

sowie in der Leber von OVA-behandelten Mäusen jedoch nicht in BSA-behandelten Mäusen.

3.1.3 Effektorzytokine

Das zweite wichtige Merkmal von CD8 Effektorzellen ist die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen. Daher wurde die Effektorfunktion der OT-I T-Zellen hinsichtlich der IFN- γ Produktion *ex vivo* untersucht. Nach Restimulation mit dem nominalen Peptidantigen OVA₂₅₇₋₂₆₄ produzierte ein signifikant größerer Teil der OT-I T-Zellen aus OVA-behandelten im Vergleich zu BSA-behandelten Kontrollmäusen IFN- γ (Abb. 1B). Auch nach der Antigen-unabhängigen Restimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)/Ionomycin wiesen OT-I T-Zellen aus OVA-behandelten Mäusen eine deutlich höhere IFN- γ Produktion als die BSA-behandelten Kontrollen auf (Daten nicht gezeigt). IFN- γ produzierende T-Zellen wurden in Milz, mLN, Lamina propria sowie in intrahepatischen Lymphozyten gefunden, wobei der größte Anteil IFN- γ positiver T-Zellen in der Milz vorkam (Abb. 1B). Auch eine etwaige Expression der funktionell relevanten Zytokine IL-2, welches eine wichtige Rolle in der T-Zell-Proliferation spielt, des pro-inflammatorischen Zytokins IL-17A und von IL-10, welches als regulatorisch, hemmend gilt, wurde untersucht. Es wurde jedoch durchflusszytometrisch keine Expression dieser Zytokine (<3%) in OT-I T-Zellen nach der Restimulation *ex vivo* nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

3.1.4 Zytotoxizität

Das Hauptmerkmal von CD8 T-Zellen ist ihre Fähigkeit, andere Zellen, die das nominale Antigen auf MHC-I Molekülen präsentieren, spezifisch zu lysieren. Diese zytotoxische Kapazität der *in vivo* aktivierten OT-I T-Zellen wurde am Tag 5 nach der rektalen Behandlung mittels *in-vivo-Zytolyse Assay* untersucht. Wie erwartet, wurde eine signifikant höhere spezifische Lyserate von OVA₂₅₇₋₂₆₄-beladenen Zielzellen bei OVA-behandelten Mäusen im Vergleich zu BSA-behandelten Kontrollen beobachtet (Abb. 1C). Eine spezifische Zytolyseaktivität wurde in Milz und mLN, aber nicht in der Leber nachgewiesen, wahrscheinlich weil die OVA₂₅₇₋₂₆₄-beladenen Zielzellen die Leber passieren, aber nicht in die intrahepatischen Kompartimente migrieren, in denen sich die Effektor OT-I T-Zellen befinden.

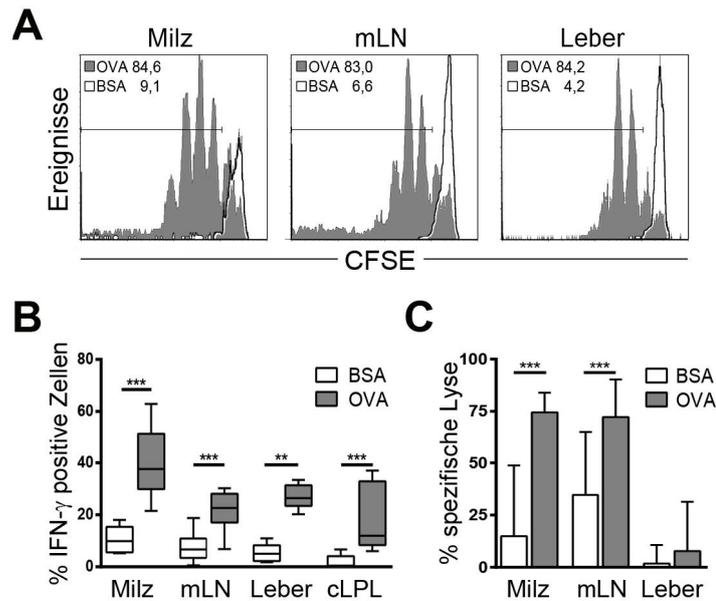


Abb. 1: Die rektale Gabe von Ovalbumin führt zur Aktivierung von OT-I T-Zellen.

Wildtyp-C57Bl/6 Mäuse wurden rektal mit Ethanol, gefolgt von Ovalbumin (OVA) oder Rinderserumalbumin (BSA) behandelt und gleichzeitig wurden naive OT-I T-Zellen *i.v.* transfertiert. (A) Die Proliferation von OT-I T-Zellen wurde mittels CFSE-Färbung durchflusszytometrisch am Tag 2 bestimmt. Repräsentative Plots bezogen auf CD90.1⁺ OT-I Zellen von zwei Experimenten (n=8) werden gezeigt. Der Prozentsatz der proliferierenden Zellen ist oben links dargestellt. (B) Die Produktion von IFN- γ nach Stimulation mit OVA₂₅₇₋₂₆₄ wurde für Zellen aus der Milz, mesenterialen Lymphknoten (mLN), Leber und Lymphozyten aus der Lamina propria des Kolon (cLPL) am Tag 4 analysiert. Der Box-Plot zeigt den prozentualen Anteil IFN- γ ⁺, CD90.1⁺ OT-I Zellen, zusammengefasst aus zwei Experimenten (n=8). (C) Die zytolytische Kapazität der OT-I T-Zellen wurde mittels *in vivo* Zytolyse-Assay an Tag 5 bestimmt. Die Daten wurden aus zwei Experimenten zusammengefasst (n=8). Mann-Whitney-U-Test ** p<0.01, *** p<0.001.

Insgesamt konnte also gezeigt werden, dass adoptiv transfertierte naive OT-I CD8 T-Zellen durch die rektale Applikation von Ovalbumin Antigen-spezifisch *in vivo* aktiviert werden. Dies bestätigt die Annahme, dass das rektal applizierte Antigen die Epithelbarriere passierte und erfolgreich von Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen, prozessiert und schließlich den OT-I CD8 T-Zellen auf MHC-I kreuzpräsentiert wurde.

3.1.5 Gewichtsverlauf

Als nächstes wurde untersucht, ob die Antigen-abhängige Aktivierung der OT-I T-Zellen im GALT auch zu einer Kolitis führt. Die Mäuse wurden täglich gewogen und das Kolon vier Tage nach dem rektalen Einlauf mit einem Miniatur-Endoskop untersucht. Die Reizung der Darmschleimhaut durch Ethanol führte in beiden Behandlungsgruppen zu einer kurzzeitigen Entzündungsreaktion und leichtem

Gewichtsverlust am folgenden Tag. Am zweiten Tag nach Versuchsbeginn hatten in der mit OVA-behandelten Gruppe die Hälfte der Mäuse mehr als 10% des ursprünglichen Gewichts verloren. Demgegenüber erholten sich die BSA-behandelten Mäuse der Kontrollgruppe rasch und erreichten bis zum Tag 3 wieder ihr Ausgangsgewicht. Das Gewicht der OVA-behandelten Mäuse stieg langsam bis zum Versuchsende am Tag 4 an, jedoch erreichte ein Viertel der Mäuse bis dahin weniger als 95% ihres ursprünglichen Gewichtes (Abb. 2A). Der große Interquartilsabstand in der OVA-behandelten Gruppe verdeutlicht dabei, dass die Behandlung der Mäuse zu einer recht unterschiedlich schweren Ausprägung der Erkrankung führte. Bei schwerer erkrankten OVA-behandelten Mäusen ging der Gewichtsverlust zum Teil mit Durchfall einher.

3.1.6 Endoskopie

Am Tag 4 nach der Behandlung wurden die Mäuse mittels eines Miniatur-Endoskops rektal untersucht. Der endoskopische Befund korrelierte mit dem beobachteten Gewichtsverlauf, das heißt, schwerer erkrankte Mäuse wiesen auch endoskopisch Zeichen einer Entzündung des Kolons auf. Diese Entzündung war durch eine erhöhte Granularität und Vaskularisierung, eine reduzierte Lichtdurchlässigkeit der Darmwand und teilweise durch Fibrinablagerungen gekennzeichnet, wie beispielhaft in Abb. 2B dargestellt. Die in den OVA-behandelten Mäusen beobachtete reduzierte Lichtdurchlässigkeit und erhöhte Granularität wiesen auf eine Verdickung der Darmwand durch eine lokale Infiltration von Lymphozyten hin. Bei schwerer erkrankten Mäusen kam es zum Teil zu leichten Blutungen bei Kontakt des Endoskops mit der Darmwand und es wurden weißliche Fibrinablagerungen im Lumen als Zeichen einer noch andauernden Gewebereparatur beobachtet (Abb. 2B). Demgegenüber zeigten die BSA-behandelten Mäuse ein gesundes Kolon mit einer glatten, glänzenden Mukosa, welche regelmäßig verteilte, dünne Gefäße aufwies und die dahinter liegenden inneren Organe durchscheinen lies (Abb. 2B). Anhand der Merkmale Granularität, Vaskularisierung, Lichtdurchlässigkeit der Darmwand, Fibrinablagerungen und der Konsistenz des Kotes wurde die Schwere der Entzündung visuell quantifiziert. OVA-behandelte Mäuse wiesen einen signifikant erhöhten mittleren Gesamtscore von $4,3 (\pm 1,6)$ im Vergleich zu BSA-behandelten Mäusen mit $1,4 (\pm 1,0)$ auf (Abb. 2B).

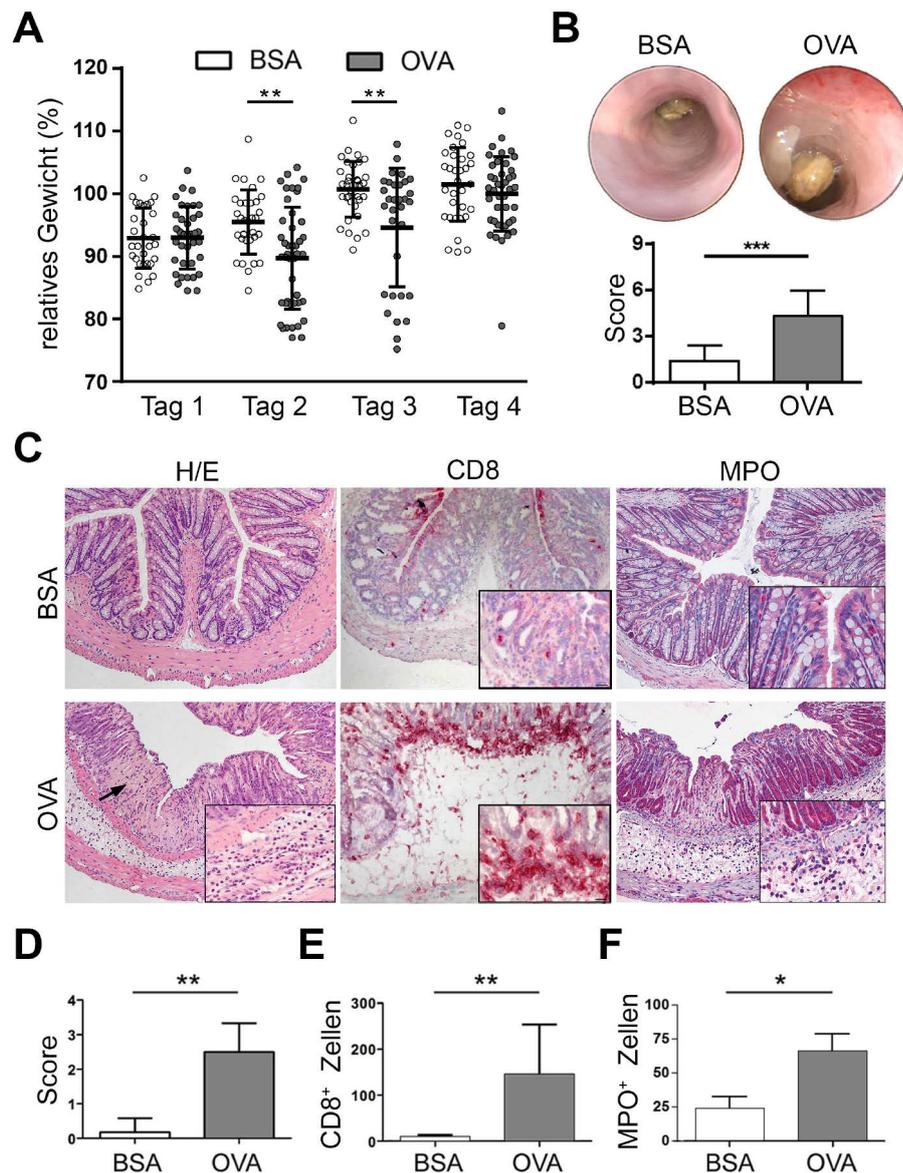


Abb. 2: Induktion einer Antigen-abhängigen Kolitis.

Wildtyp-B6 Mäuse wurden rektal mit Ethanol, gefolgt von Ovalbumin (OVA) oder Rinderserumalbumin (BSA) behandelt und naive OT-I T-Zellen wurden *i.v.* transferiert. (A) Der Dot-Plot zeigt den Verlauf des relativen Gewichts bezogen auf das Ausgangsgewicht nach dem Auslösen der OVA-Kolitis ($n \geq 32$). (B) Repräsentative endoskopische Bilder von BSA- bzw. OVA-behandelten Mäusen am Tag 4. Veränderungen hinsichtlich Granularität, Vaskularisierung, Lichtdurchlässigkeit der Darmwand, Fibrinablagerungen und der Konsistenz des Kotes wurden semi-quantitativ bewertet, der mittlere Gesamtscore ist dargestellt ($n=8$). (C) H/E-Färbung und Immunhistochemie für CD8 bzw. MPO von Kolonbiopsien, Vergrößerung 100x, Ausschnittsvergrößerung 400x. Der Pfeil weist auf die veränderte Submukosa. (D) Semi-quantitative Analyse der Histopathologie, (E) CD8 positive Zellen pro 10 Hauptgesichtsfeldern (*High Power Field*: HPF entspricht $0,237 \text{ mm}^2$), (F) MPO positive Zellen pro 10 HPF. Mittelwert + Standardabweichung ($n=6$), Mann-Whitney-U-Test * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

3.1.7 Histologie

Zusätzlich zur endoskopischen Untersuchung wurde der Grad der Kolitis auch mittels Histologie und Immunhistochemie beurteilt. Dazu wurden die Mäuse am Tag 4 getötet und der absteigende Kolonabschnitt entnommen. Histologisch zeigten sich in der Hämatoxylin/Eosin (H/E)-Färbung milde bis mittelgradige Anzeichen einer Kolitis, einschließlich diffuser Infiltrate mononukleärer Zellen innerhalb der Mukosa und Submukosa, Zottenödeme sowie milder Epithelhyperplasie (Abb. 2C). Die in der Abbildung markierte, deutlich entzündliche Verdickung der Submukosa spiegelt dabei den endoskopischen Befund einer reduzierten Lichtdurchlässigkeit und erhöhten Granularität wider. Die Infiltrate wurden anhand immunhistochemischer Färbungen für CD8 α , das unter anderem eine Subgruppe von T-Zellen charakterisiert, und für myeloide Peroxidase (MPO), welche typischerweise von Neutrophilen und Monozyten exprimiert wird, näher spezifiziert. Es zeigte sich eine erhöhte Zahl CD8⁺ und MPO⁺ Zellen im Epithel und der Lamina propria von OVA-behandelten im Vergleich zu BSA-behandelten Mäusen (Abb. 2C). Eine semiquantitative Auswertung der histologischen Färbungen bestätigte den beobachteten signifikanten Anstieg von CD8⁺ (Abb. 2E) und MPO⁺ Zellen (Abb. 2F) und belegte den erhöhten mittleren histologischen Kolitis-Score von 2,5 (\pm 0,8) bei OVA-behandelten Mäusen verglichen mit einem Score von 0,2 (\pm 0,4) in der BSA-behandelten Kontrolle (Abb. 2D).

Zusammengefasst konnte erfolgreich ein Antigen-abhängiges Kolitis-Modell in Mäusen etabliert werden, das durch lokal im Darm aktivierte CD8 T-Zellen ausgelöst wird. Im Weiteren wird dieses Modell als OVA-Kolitis bezeichnet.

3.2 Im Darm aktivierte CD8 T-Zellen migrieren in die Leber

3.2.1 Aktivierungsmarker

Die Analyse der Effektorfunktionen der OT-I T-Zellen nach dem Auslösen einer OVA-Kolitis in Wildtyp-B6 Mäusen zeigte, dass in OVA-behandelten Mäusen proliferierende T-Zellen auch in der Leber vorhanden waren. Um den Phänotyp dieser Leber-infiltrierenden OT-I T-Zellen zu näher charakterisieren, wurden typische mit T-Zellaktivierung in Zusammenhang stehende Oberflächenmoleküle

durchflusszytometrisch untersucht. Aus der Leber von OVA-behandelten Mäusen isolierte OT-I T-Zellen zeigten einen aktivierten Phänotyp, gekennzeichnet durch eine niedrige Expression von CD62L und eine hohe Expression von CD44 (Abb. 3A). Dabei wiesen sie verglichen mit aus den mLN OVA-behandelter Mäuse isolierten OT-I T-Zellen einen erhöhten Anteil des vollständig aktivierten Phänotyps CD62L⁻, CD44^{high} auf. Demgegenüber zeigte die Mehrheit der aus den mLN und der Leber von BSA-behandelten Mäusen isolierten OT-I T-Zellen einen naiven Phänotyp (CD62L⁺, CD44^{low}), ähnlich wie OT-I T-Zellen vor dem adoptiven Transfer (Abb. 3A).

3.2.2 Migration

Angesichts der oben dokumentierten Antigen-abhängigen Aktivierung der OT-I T-Zellen im GALT wurde überprüft, ob diese T-Zellen auch einen typischen Darm-*Homing* Phänotyp aufweisen. Dieser Phänotyp ist durch die Expression der für die Migration in den Darm wichtigen Oberflächenmoleküle Integrin $\alpha 4\beta 7$ und des Chemokinrezeptors CCR9 gekennzeichnet (Johansson-Lindbom *et al.*, 2003). Wie erwartet, zeigten OT-I T-Zellen aus den mLN OVA-behandelter Mäuse eine deutlich verstärkte Expression des Integrins $\alpha 4\beta 7$, während OT-I T-Zellen aus BSA-behandelten Mäusen eine vergleichbar niedrige Expression wie naive OT-I T-Zellen vor dem Transfer oder wie endogene Wildtyp-CD8 T-Zellen aufwiesen (<3%). Dabei zeigten die aus der Leber isolierten OT-I T-Zellen gegenüber Zellen aus den mLN von OVA-behandelten Mäusen einen erhöhten Anteil an Integrin $\alpha 4\beta 7$ (Abb. 3B). Interessanterweise war der Betrag dieser Steigerung um 20% genau so groß, wie der oben beschriebene Anstieg der CD62L⁻, CD44^{high} OT-I T-Zellen. Da das Integrin $\alpha 4\beta 7$ in Abhängigkeit von aktiver Retinolsäure insbesondere im GALT auf T-Lymphozyten eingepägt wird (Mora *et al.*, 2003), könnte die Anreicherung dieser $\alpha 4\beta 7$ positiven OT-I T-Zellen auf eine gesteigerte Migration von im Darm aktivierten Zellen in die Leber zurückzuführen sein. Daher wurden weitere für die Migration von CD8 T-Zellen in die Leber relevante Integrine und Chemokinrezeptoren durchflusszytometrisch untersucht.

3.2.3 Chemokinrezeptoren

Zunächst wurde die Expression des dem Darm-*Homing* zugeordneten Chemokinrezeptors CCR9 analysiert. CCR9 wurde sowohl auf naiven OT-I T-Zellen vor dem Transfer als auch auf OT-I T-Zellen nachgewiesen, die 4 Tage nach dem Auslösen einer OVA-Kolitis aus den OVA- bzw. BSA-behandelten Mäusen isoliert wurden. Im Gegensatz zu der für CD4 T-Zellen bekannten Retinolsäure-abhängigen Steigerung, war dabei eine leichte Reduktion der basalen Expression von CCR9 auf aktivierten OT-I T-Zellen aus OVA-behandelten Mäusen zu verzeichnen (Abb. 3C). Als weitere Kontrolle wurden zusätzlich endogene Wildtyp-T-Zellen analysiert. Hierbei bestätigte sich die unterschiedliche basale Expression von CCR9 auf CD8 und CD4 T-Zellen (Abb. 3D).

Die unter anderem in Hepatitis und Kolitis für die Migration in die entzündeten Gewebe als wichtig beschriebenen Chemokinrezeptoren CCR5 (Mazzucchelli *et al.*, 1996; Murai *et al.*, 1999) und CXCR3 (Qin *et al.*, 1998; Shields *et al.*, 1999) wurden ebenfalls untersucht. Entgegen den Erwartungen, konnte keine gesteigerte Expression von CCR5 auf aktivierten OT-I T-Zellen aus OVA-behandelten gegenüber BSA-behandelten Mäusen detektiert werden. In Milz und mLN exprimierten ca. 9-11% der OT-I T-Zellen CCR5, in der Leber ca. 4%. Einzig aus dem Kolon isolierte OT-I T-Zellen zeigten einen nennenswerten Anteil von ca. 42% CCR5⁺ Zellen, eine ähnliche Verteilung zeigten auch die endogenen CD8 T-Zellen (Tabelle 4, siehe Anhang 6.1 und Daten nicht gezeigt). Demgegenüber wurde für den Chemokinrezeptor CXCR3 eine deutlich vermehrte Expression auf OT-I T-Zellen aus OVA-behandelten Mäusen nachgewiesen, während die Mehrheit der OT-I T-Zellen aus BSA-behandelten Mäusen wie naive OT-I T-Zellen CXCR3⁻ blieben (Abb. 3C).

3.2.4 Integrine

Neben Chemokinen spielen vor allem Integrine eine entscheidende Rolle für die Migration von T-Zellen (Ley *et al.*, 2007). Angesichts der Vielzahl von Kombinationen der Integrin-Untereinheiten, welche die Spezifität der Integrine bestimmen, wurde die Analyse auf den wichtigsten zweiten Bindungspartner für $\alpha 4$, die Integrin-Untereinheit $\beta 1$ beschränkt. Das Integrin $\alpha 4\beta 1$ vermittelt die Extravasation von T-Zellen über die

Bindung an die Zelladhäsionsmoleküle VCAM-1 und MAdCAM-1, und ist neben $\alpha 4\beta 7$ wichtig für die Migration in den Darm (Rivera-Nieves *et al.*, 2005). Aus den mLN OVA-behandelter Mäuse isolierte OT-I T-Zellen zeigten eine deutliche Heraufregulation der Integrin-Untereinheit $\beta 1$, während OT-I T-Zellen aus BSA-behandelten Mäusen eine vergleichbar niedrige Expression wie naive OT-I T-Zellen vor dem Transfer aufwiesen (Abb. 3B). Dabei zeigten die aus der Leber isolierten OT-I T-Zellen gegenüber Zellen aus den mLN von OVA-behandelten Mäusen wiederum einen erhöhten Anteil der Integrin-Untereinheit $\beta 1$.

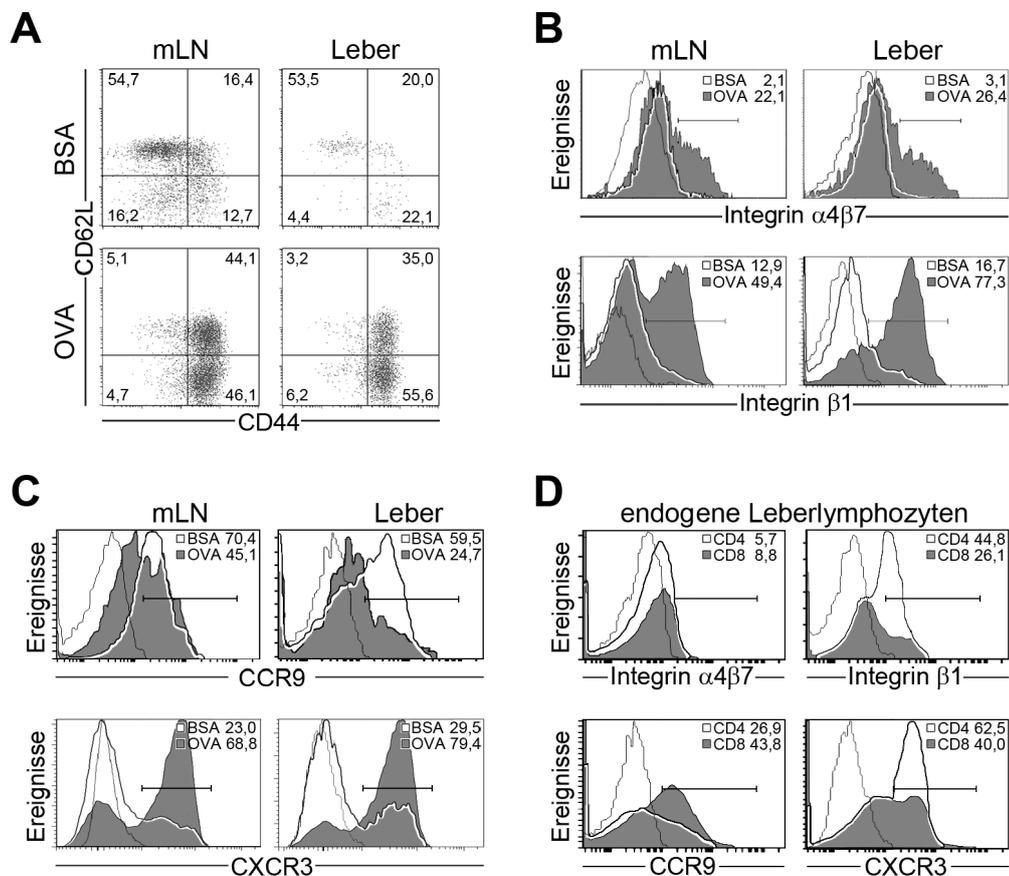


Abb. 3: Phänotypische Analyse der im GALT aktivierten CD8 OT-I T-Zellen.

In Wildtyp-B6 Mäusen wurde wie beschrieben eine OVA-Kolitis ausgelöst. Am Tag 4 nach der Behandlung wurde der Phänotyp der OT-I T-Zellen aus mesenterialen Lymphknoten (mLN) und Leber hinsichtlich der Expression von (A) CD62L und CD44, (B) des Integrins $\alpha 4\beta 7$ und der Integrin-Untereinheit $\beta 1$ sowie (C) der Chemokinrezeptoren CCR9 und CXCR3 analysiert. In (D) ist zum Vergleich der Phänotyp der endogenen CD4 (weiß) bzw. CD8 (grau) positiven Lymphozyten aus der Leber dargestellt. Repräsentative Plots bzw. Histogramme bezogen auf CD90.1⁺ OT-I Zellen (A-C) oder Lymphozyten gemäß des FSC/SSC (D) von zwei Experimenten (n=8) werden gezeigt. Der prozentuale Anteil der auf die jeweilige Region entfallenden Zellen ist in den Graphen angegeben.

Zusammenfassend zeigten die OT-I T-Zellen nach dem Auslösen einer OVA-Kolitis einen aktivierten Phänotyp, charakterisiert durch eine signifikant verstärkte Expression von Integrinen und Chemokinrezeptoren, welche für die Migration in den Darm erforderlich sind. Dennoch kam es zu einer Anreicherung dieser OT-I T-Zellen insbesondere in der Leber.

3.3 Im Darm aktivierte CD8 T-Zellen lösen eine immunvermittelte Cholangitis aus

3.3.1 ASBT-OVA Mäuse

Als nächstes sollte untersucht werden, ob diese in die Leber migrierten, aktivierten OT-I T-Zellen dort auch eine Entzündung auslösen können. Dazu wurde eine OVA-Kolitis in transgenen ASBT-OVA Mäusen ausgelöst, welche unter der Kontrolle des *Apical Sodium Bile Transporter* (ASBT) Promotor als Modellantigen eine verkürzte Form von Ovalbumin in den Gallengängen exprimieren. Wie frühere Arbeiten in der Arbeitsgruppe gezeigt haben, kommt es in diesen Mäusen nach dem Transfer von OT-I T-Zellen zu einer Antigen-spezifischen Aktivierung der T-Zellen in der Leber und dem Leberlymphknoten, was jedoch nicht zu einer Pathologie in der Leber führt (Derkow *et al.*, 2007).

3.3.2 T-Zell-Aktivierung

Erwartungsgemäß zeigte sich am Tag 2 nach dem Auslösen der OVA-Kolitis eine Proliferation der OT-I T-Zellen sowohl in OVA-behandelten als auch in BSA-behandelten ASBT-OVA Mäusen. Dabei führte die zusätzliche Applikation des Antigens im Darm in OVA-behandelten ASBT-OVA Mäusen gegenüber den Kontrolltieren zu einer deutlich verstärkten Proliferation der OT-I T-Zellen (Abb. 4A). Dennoch zeigte sich die mit der Aktivierung von CD8 T-Zellen verbundene Produktion von IFN- γ nach Restimulation mit dem nominalen Peptidantigen OVA₂₅₇₋₂₆₄ durch die rektale OVA-Behandlung der ASBT-OVA Mäuse in den OT-I T-Zellen auf Einzelzellenebene kaum erhöht. Da jedoch durch das Auslösen der OVA-Kolitis in den ASBT-OVA Mäusen mehr OT-I T-Zellen aktiviert wurden, stieg der Anteil IFN- γ produzierender OT-I T-Zellen bezüglich der gesamten CD8 T-Zell-Population in der Milz (10x) und Leber (6,8x) signifikant an (Abb. 4B). Interessanterweise blieb die Zahl der

IFN- γ produzierenden OT-I T-Zellen in den mLN OVA-behandelter gegenüber BSA-behandelten ASBT-OVA Mäusen konstant, was darauf hindeutet, dass die dort aktivierten OT-I T-Zellen den Lymphknoten verlassen und nicht im selben Maße wie in Wildtyp-B6 Mäusen rezirkulieren. Das Antigen wurde in Wildtyp-B6 Mäusen nur einmalig appliziert, daher war die Immunreaktion erwartungsgemäß limitiert. Demgegenüber war aufgrund der transgenen Expression des Antigens in ASBT-OVA Mäusen eine Antigen-abhängige Retention der aktivierten OT-I T-Zellen in der Leber zu erwarten.

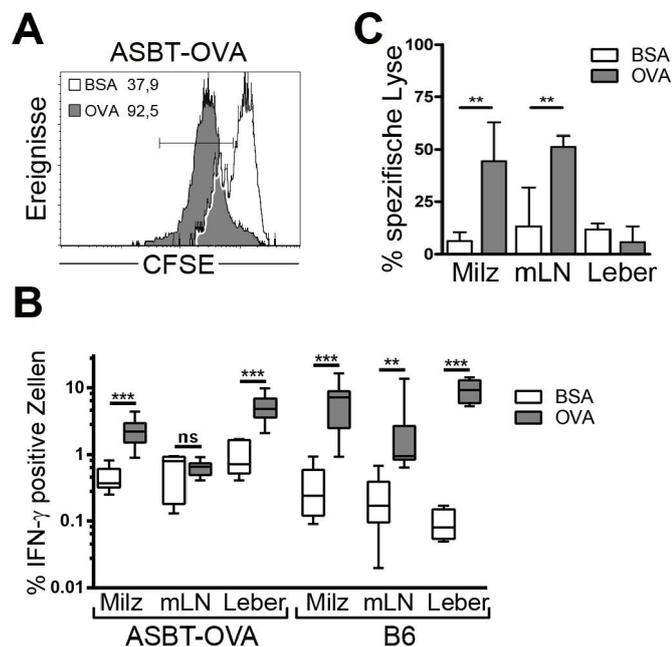


Abb. 4: OVA-Kolitis führt zur Aktivierung von OT-I T-Zellen in ASBT-OVA Mäusen.

In ASBT-OVA und Wildtyp-B6 Mäusen wurde eine OVA-Kolitis ausgelöst. (A) Die Proliferation von OT-I T-Zellen wurde mittels CFSE-Färbung durchflusszytometrisch am Tag 2 bestimmt. Ein repräsentativer Plot von Leberlymphozyten bezogen auf CD90.1⁺ OT-I Zellen von zwei Experimenten (n=8) ist abgebildet. Der Prozentsatz der proliferierenden Zellen ist oben links dargestellt. (B) Die Produktion von IFN- γ nach Stimulation mit OVA₂₅₇₋₂₆₄ wurde für Zellen aus der Milz, mesenterialen Lymphknoten (mLN) und Leber am Tag 4 analysiert. Der logarithmisch dargestellte Box-Plot zeigt den prozentualen Anteil IFN- γ positiver bezogen auf CD8⁺ Zellen, zusammengefasst aus zwei Experimenten (n=8). (C) Die zytolytische Kapazität der OT-I T-Zellen wurde mittels *in vivo* Zytolyse-Assay an Tag 5 bestimmt. Die Daten wurden aus zwei Experimenten zusammengefasst (n=8). Mann-Whitney-U-Test ** p<0.01, *** p<0.001, ns nicht signifikant, p>0,05.

Zusätzlich zur Zytokin-Expression wurde die zytolytische Kapazität der OT-I T-Zellen nach dem Auslösen der OVA-Kolitis in ASBT-OVA Mäusen mittels *in vivo* Zytolyse-Assay untersucht. Übereinstimmend mit früheren Ergebnissen der Arbeitsgruppe (Derkow *et al.*, 2007) zeigte sich in den BSA-behandelten ASBT-OVA

Mäusen nur eine geringe spezifische Lyserate, welche durch die rektale Applikation von OVA deutlich anstieg (Abb. 4C). Wie bei Wildtyp-B6 Mäusen konnte nur eine geringe spezifische Zytolyse in der Leber gemessen werden, was wahrscheinlich wie oben erwähnt, auf die unterschiedliche Kompartimentalisierung der aktivierten OT-I T-Zellen und der naiven markierten Zielzellen in der Leber zurückzuführen war.

Das OVA-Kolitis Modell konnte also erfolgreich von Wildtyp-B6 Mäusen auf den transgenen ASBT-OVA Stamm übertragen werden. Damit wurde eine Situation geschaffen, in der CD8 T-Zellen im GALT durch exogenes Antigen aktiviert werden und in den Gallengängen der Leber auf das gleiche endogene Antigen treffen. Ob in die Leber migrierende, aktivierte OT-I T-Zellen dort auch eine Entzündung auslösen können, wurde anhand (immun-) histologischer Färbungen und der bei Leberentzündungen aus Hepatozyten ins Blut freigesetzten Alaninaminotransferase (ALT) untersucht.

3.3.3 Histologie

Die histologische Auswertung der H/E-Färbungen von Leberschnitten aus OVA-behandelten ASBT-OVA Mäusen zeigte mononukleäre Infiltrate in den Portalfeldern ohne Hinweise auf lobuläre Infiltrate (Abb. 5A). Dieser Befund wurde mittels immunhistochemischer Färbungen spezifiziert, welche zeigten, dass diese Infiltrate spezifisch an den CK19⁺ Gallengängen auftraten und aus CD3⁺ T-Zellen bestanden (Abb. 5A). Dabei wurden solche periduktulären Infiltrate nur in OVA-behandelten ASBT-OVA Mäusen nicht aber in BSA-behandelten ASBT-OVA Mäusen oder OVA-behandelten Wildtyp-B6 Mäusen nachgewiesen, was die Antigenspezifität der Entzündungsreaktion in der Leber bestätigt und eine Antigen-unabhängige *Bystander*-Hepatitis ausschließt.

3.3.4 Plasma-ALT

Schließlich belegte auch die Bestimmung der Plasma-ALT-Spiegel das Vorhandensein einer Leberentzündung mit ca. 5-fach erhöhten ALT-Werten in OVA-behandelten ASBT-OVA Mäusen, während in den Kontrollgruppen keine Veränderung gegenüber dem Ausgangswert verzeichnet wurde (Abb. 5B).

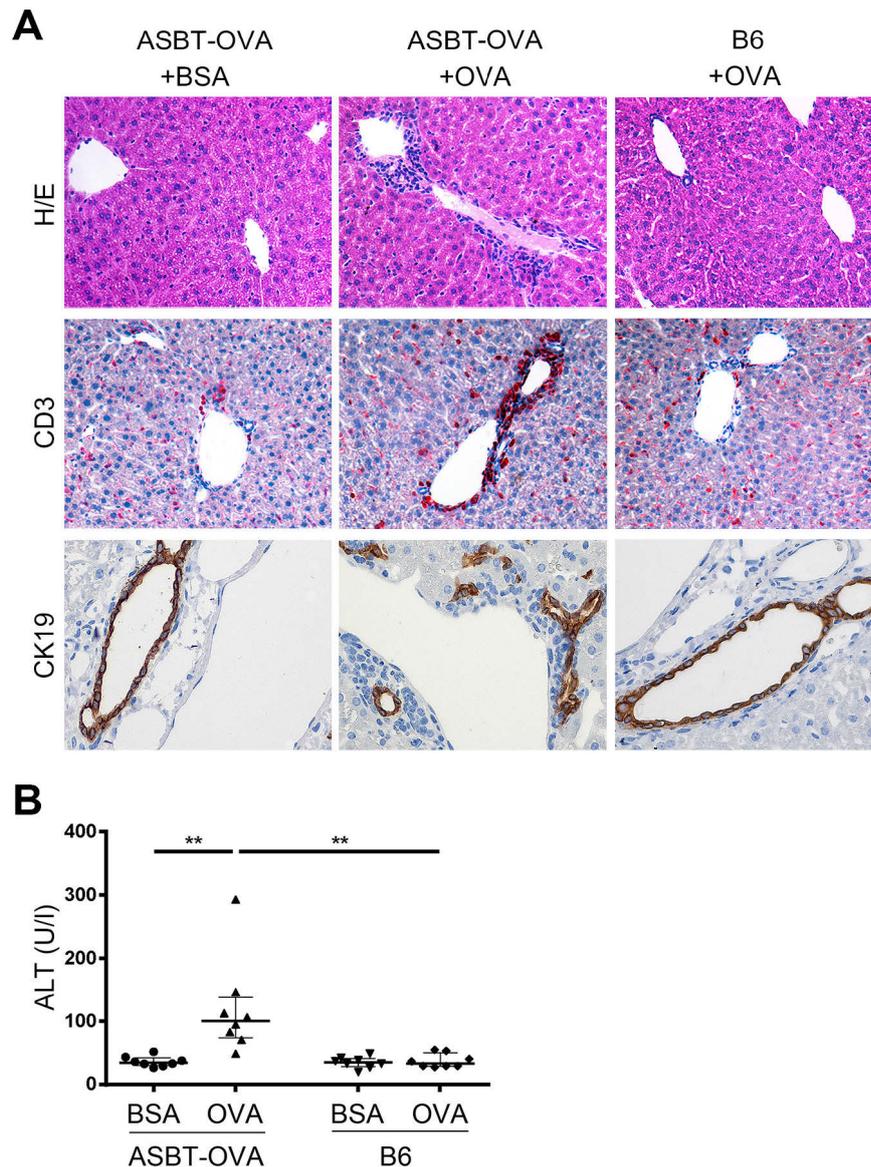


Abb. 5: Im Darm aktivierte CD8 T-Zellen lösen eine immunvermittelte Cholangitis aus.

In Wildtyp-B6 oder ASBT-OVA Mäusen wurde wie beschrieben eine OVA-Kolitis ausgelöst. Repräsentative Färbungen bzw. Immunhistochemie für (A) H/E, CD3 (rot) und CK19 (braun) von Leberbiopsien aus BSA-behandelten ASBT-OVA Mäusen, OVA-behandelten ASBT-OVA Mäusen und OVA-behandelten Wildtyp-B6 Mäusen am Tag 4 ($n = 6$); Vergrößerung 200x. (B) Plasma-ALT Konzentration am Tag 4 bezogen auf den Ausgangswert ($n = 8$). Die Daten sind aus zwei Experimenten zusammengefasst. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's post-hoc Test ** $p < 0,01$.

Zusammenfassend wiesen adoptiv transferierte OT-I Zellen nach dem Auslösen einer OVA-Kolitis in ASBT-OVA Mäusen eine ähnliche funktionelle Kapazität wie in Wildtyp-B6 Mäusen auf. Diese im Darm aktivierten OT-I T-Zellen migrierten in die Leber und lösten bei Vorhandensein desselben Antigens in den Gallengängen der Leber eine immunvermittelte Cholangitis aus.

3.4 *In vitro* aktivierte CD8 T-Zellen führen nicht zu einer Cholangitis

3.4.1 *In vitro* Aktivierung

Um zu untersuchen, ob für die Induktion einer immunvermittelten Cholangitis allein das Vorhandensein aktivierter CD8 T-Zellen ausreicht oder eine Aktivierung im GALT notwendig ist, wurden OT-I T-Zellen *in vitro* aktiviert und adoptiv in ASBT-OVA Mäuse transferiert. Dabei wurden die Bedingungen der *in vitro* Stimulation mit anti-CD3 ϵ und anti-CD28 so gewählt, dass die gewonnenen OT-I T-Zellen nach der Kultur einen vergleichbaren Phänotyp hinsichtlich der Aktivierungsmarker CD62L und CD44 wie durch eine OVA-Kolitis *in vivo* aktivierte OT-I T-Zellen aufwiesen (Abb. 6A, vgl. Abb. 3A). Diese *in vitro* aktivierten OT-I T-Zellen wurden adoptiv in ASBT-OVA Mäuse transferiert und nach vier Tagen der Phänotyp der transferierten OT-I T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

3.4.2 Phänotyp *ex vivo*

Wie erwartet, zeigten re-isolierte *in vitro* aktivierte OT-I T-Zellen gegenüber T-Zellen aus OVA-behandelten ASBT-OVA Mäusen keine vermehrte Expression des Darm-spezifischen Integrins $\alpha 4\beta 7$, während ähnliche Expressionsstärken des Integrins $\beta 1$ in den mLN vorkamen (Abb. 6B). Gleichzeitig wiesen die aus der Leber isolierten OT-I T-Zellen gegenüber dem mesenterialen Lymphknoten eine höhere Expression der untersuchten Integrine auf, was auf eine spezifische Retention von Integrin positiven Zellen in der Leber hindeutet. Interessanterweise war der Chemokinrezeptor CXCR3 auf re-isolierten *in vitro* aktivierten OT-I T-Zellen aus der Leber schwächer exprimiert als in den mLN derselben Mäuse (Abb. 6B).

Die differenzielle Expression der Migrationsmoleküle führte entsprechend zu einer veränderten Verteilung der *in vitro* aktivierten OT-I in ASBT-OVA Mäusen. In der Milz kam es zu einer signifikanten Zunahme, etwa doppelt so viele *in vitro* aktivierte OT-I T-Zellen wurden gegenüber BSA-behandelten ASBT-OVA Mäusen detektiert, während in OVA-behandelten ASBT-OVA Mäusen etwa gleich viele OT-I Zellen vorkamen (BSA $0,14 \pm 0,07\%$, OVA $0,24 \pm 0,07\%$, *in vitro* $0,29 \pm 0,06\%$ der Gesamtlymphozyten, U-Test $p < 0,05$). In den mLN gab es keinen signifikanten Unterschied

zwischen den Gruppen (BSA $0,81 \pm 0,06\%$, OVA $0,80 \pm 0,15\%$, *in vitro* $0,66 \pm 0,05\%$ der Gesamtlymphozyten). Überraschenderweise kam es trotz der *in vitro* Stimulation nicht zu einer Akkumulation von OT-I T-Zellen in der Leber, es fanden sich nicht mehr *in vitro* aktivierte T-Zellen in der Leber als in der BSA-behandelten Kontrolle, während ein signifikanter Anstieg von OT-I T-Zellen in den OVA-behandelten ASBT-OVA Mäusen zu verzeichnen war (Abb. 6E)

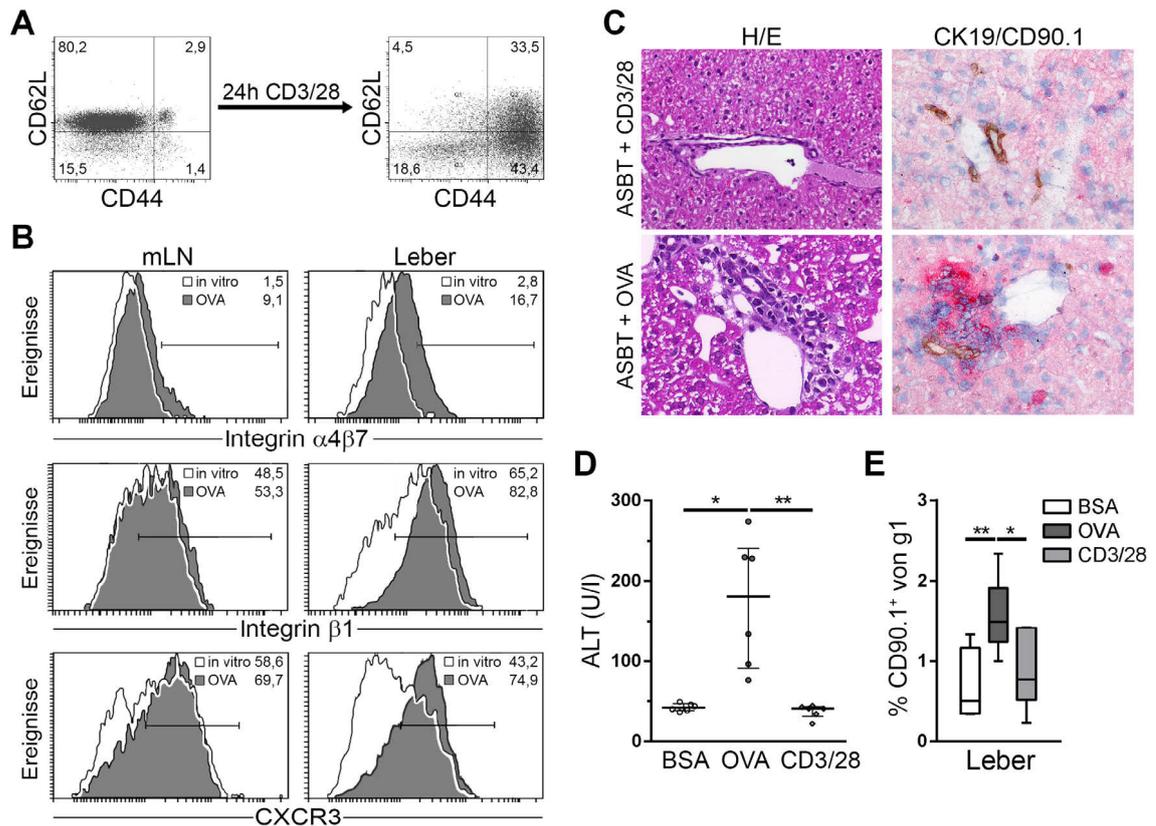


Abb. 6: *In vitro* aktivierte CD8 T-Zellen vermitteln keine immunvermittelte Cholangitis

Naive OT-I T-Zellen wurden isoliert und für 24h *in vitro* mit plattengebundenen anti-CD3 ϵ und löslichem anti-CD28 Antikörpern stimuliert. (A) Der Phänotyp der OT-I T-Zellen wurde vor und nach der Kultur hinsichtlich der Expression von CD62L und CD44 durchflusszytometrisch analysiert. (B) Die *in vitro* aktivierten OT-I T-Zellen wurden *i.v.* in ASBT-OVA Mäusen transferiert, oder eine OVA-Kolitis wurde wie oben beschrieben ausgelöst und naive OT-I T-Zellen *i.v.* transferiert. Am Tag 4 nach dem Transfer wurde der Phänotyp der OT-I T-Zellen aus mesenterialen Lymphknoten (mLN) und Leber hinsichtlich der Expression von Integrin $\alpha 4\beta 7$, der Integrin-Untereinheit $\beta 1$ und dem Chemokinrezeptor CXCR3 analysiert. Repräsentative Plots bzw. Histogramme bezogen auf CD90.1⁺ OT-I Zellen von zwei Experimenten (n=6) sind dargestellt. Der prozentuale Anteil der auf die jeweilige Region entfallenden Zellen ist in den Graphen angegeben. (C) H/E-Färbung und CK19/CD90.1 Immunhistochemie von Leberbiopsien am Tag 4 nach dem T-Zell-Transfer (n=6); Vergrößerung 200x. (D) ALT-Konzentration im Plasma am Tag 4, aus zwei Experimenten zusammengefasst (n=6). (E) Am Tag 4 wurden nicht-parenchymale Zellen aus der Leber isoliert und der Anteil CD90.1 positiver OT-I T-Zellen an den Gesamtlymphozyten (FFC/SSC) durchflusszytometrisch bestimmt; aus zwei Experimenten zusammengefasste Daten (n=6). Kruskal-Wallis-Test (Dunn's post-hoc Test) * p < 0,05; ** p < 0,01.

3.4.3 Cholangitis

Dies spiegelte sich auch in der (Immun-) Histologie und in der Plasma-ALT Konzentration wider. *In vitro* aktivierte und in ASBT-OVA Mäuse transferierte OT-I T-Zellen bildeten in der Leber von ASBT-OVA Mäusen kein periduktorales Infiltrat aus, wie es nach dem Auslösen einer OVA-Kolitis der Fall war (Abb. 6C). Gleichzeitig wurde nur in den ASBT-OVA Mäusen, bei denen eine OVA-Kolitis ausgelöst wurde, ein signifikanter Anstieg der Plasma-ALT Konzentration gemessen, jedoch nicht nach dem Transfer *in vitro* aktivierter OT-I T-Zellen (Abb. 6D).

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass *in vitro* aktivierte CD8 T-Zellen in ASBT-OVA Mäusen keine immunvermittelte Cholangitis auslösen, sondern eine Aktivierung *in vivo* im GALT notwendig war.

3.5 Chronische Kolitis führt zu einem pro-inflammatorischen Milieu in der Leber

3.5.1 Chronische Kolitis

Da die PSC gehäuft bei Patienten mit CED – insbesondere mit einer Entzündung des Kolons – auftritt, wurde untersucht, ob eine chronische Kolitis *per se* Änderungen im lokalen immunologischen Umfeld der Leber verursacht, welche die Entstehung von Autoimmunität begünstigen könnten. Hierzu wurde in ASBT-OVA und Wildtyp-B6 Mäusen durch die wiederholte Gabe von Dextransulfat (DSS) über das Trinkwasser eine chronische Kolitis ausgelöst (Wirtz *et al.*, 2007). Um den Verlauf der Erkrankung zu verfolgen, diente das Gewicht als wichtiger Parameter. Die DSS-behandelten Mäuse verloren jeweils gegen Ende der 7-tägigen Behandlungsphasen deutlich an Gewicht und erholten sich in den Phasen mit normalem Trinkwasser innerhalb von ca. einer Woche (Abb. 7A). Zur Verifizierung der Erkrankung wurden die Mäuse nach 9 Wochen mittels Miniatur-Endoskop koloskopisch untersucht. Es zeigte sich bei der Mehrheit der behandelten Mäuse eine ausgeprägte Granularität mit Hyperplasien, eine veränderte Vaskularisierung und eine reduzierte Lichtdurchlässigkeit der Darmwand als typische Kennzeichen einer chronischen Kolitis (Abb. 7B). Histologisch zeigten sich Störungen der Kryptenarchitektur, Epithelhyperplasie, eine deutlich entzündliche Verdickung der Submukosa und mononukleäre Infiltrate mit MPO⁺ Neutrophilen und

Monozyten (Abb. 7C). Die semiquantitative Auswertung der histologischen Färbungen bestätigte einen signifikanten Anstieg MPO⁺ Zellen und einen erhöhten mittleren histologischen Kolitis-Score (Abb. 7D). Demnach hatte die DSS-Behandlung erfolgreich eine chronische Kolitis ausgelöst und die Auswirkungen dieser auf die Leber wurden im Weiteren untersucht.

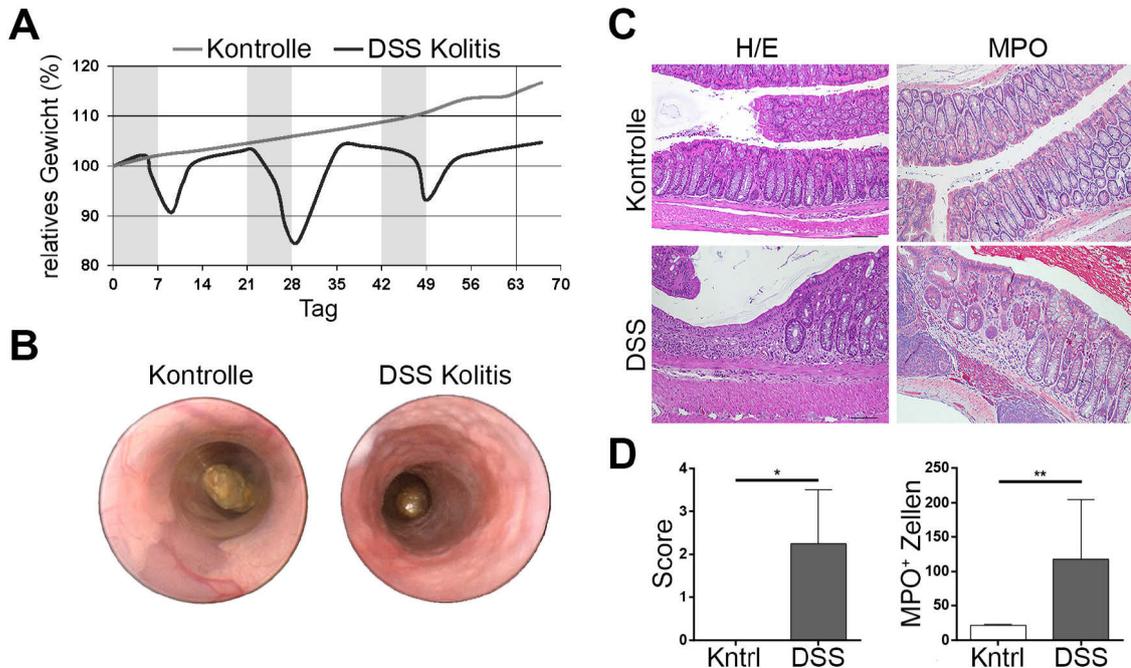


Abb. 7: Chronische DSS-Kolitis in ASBT-OVA und Wildtyp-B6 Mäusen

Eine chronische Kolitis wurde in ASBT-OVA und Wildtyp-B6 Mäusen durch die wiederholte Gabe von 2% DSS im Trinkwasser (grau markierte Zeiträume) ausgelöst. (A) Das mittlere Gewicht relativ zum Ausgangsgewicht am Tag 0 eines Experimentes ist exemplarisch dargestellt (n=6). (B) Repräsentative endoskopische Bilder von Kontroll- bzw. DSS-behandelten Mäusen am Tag 63. (C) H/E-Färbung und Immunhistochemie für MPO von Kolonbiopsien am Tag 63, Vergrößerung 100x. (D) Semi-quantitative Analyse der Histopathologie und MPO⁺ Zellen pro 10 HPF. Mittelwert + Standardabweichung (n = 6), Mann-Whitney-U-Test * p <0,05, ** p <0,01.

3.5.2 Intrahepatische T-Zellen

Zunächst wurde geprüft, ob die chronische Entzündung im Darm zu einer veränderten Zusammensetzung der T-Zell-Populationen in der Leber führt. Während in der Leber von gesunden Mäusen etwa gleich viele CD4 und CD8 T-Zellen vorkamen (CD4/CD8 1,11±0,01), wiesen die nicht-parenchymalen Zellen aus der Leber von DSS behandelten Mäusen ein zu CD8 hin verschobenes Verhältnis von CD4 zu CD8 Zellen auf (CD4/CD8 0,41±0,12). Dabei zeigten viele der endogenen CD4 und CD8 T-Zellen in Mäusen mit chronischer Kolitis im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren

einen aktivierten Phänotyp (CD44^{hi}), wobei ein stärkerer Anstieg bei den CD8 T-Zellen beobachtet wurde (Abb. 8A). Zugleich exprimierten ein größerer Anteil der T-Zellen aus der Leber von Mäusen mit chronischer DSS-Kolitis das Integrin $\alpha 4\beta 7$, was darauf hindeutet, dass diese T-Zellen ursprünglich im GALT aktiviert wurden. Als weiterer Dimerisierungspartner von $\alpha 4$ wurde wie weiter oben beschrieben die Expression der Integrin-Untereinheit $\beta 1$ untersucht. Insbesondere bei CD8 T-Zellen zeigte sich eine Verdreifachung der Integrin-Untereinheit $\beta 1$ positiven Zellen in der Leber, wenn die Mäuse an einer chronischen DSS-Kolitis erkrankt waren.

3.5.3 Adhäsionsmoleküle und Zytokine

In Hinblick auf die erhöhte Zahl aktivierter T-Zellen in der Leber von Mäusen mit einer chronischen DSS-Kolitis stellte sich die Frage, ob eine veränderte Expression von Zelladhäsionsmolekülen und pro-inflammatorischen Zytokinen in der Leber für die T-Zell-Aktivierung und Retention verantwortlich sein könnte. Hierzu wurde aus Leberproben die Gesamt-RNA isoliert und mittels *Realtime* RT-PCR (reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion) untersucht. ICAM-1 und VCAM-1, die als Bindungspartner für Integrine auf aktivierten T-Zellen dienen (Ley *et al.*, 2007), waren in DSS-behandelten Mäusen signifikant heraufreguliert (Abb. 8B), während keine aberrante Expression des typischerweise im Darm exprimierten MAdCAM-1 in der Leber detektiert werden konnte. Daneben zeigten sich die Chemokine CCL25 und CXCL10 als Liganden für CCR9 bzw. CXCR3 sowie die pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-18 in der Leber von DSS-behandelten Mäusen signifikant erhöht (Abb. 8B). Da für die Rekrutierung von Lymphozyten die Expression der Zelladhäsionsmoleküle insbesondere auf den sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) entscheidend ist (John und Crispe, 2004), wurden zusätzlich LSEC isoliert und mittels *Realtime* RT-PCR untersucht. In LSEC fand sich eine starke Expression von ICAM-1 und VCAM-1 mit einem ähnlichen Verhältnis zwischen DSS-behandelten und unbehandelten Kontrollmäusen wie in den Leberproben, sowie eine sehr geringe basale Expression von MAdCAM-1 (Abb. 8C). Dabei spiegelte das in LSEC gegenüber dem Gesamtgewebe aus Leberbiopsien mehr als 10-fach erhöhte Expressionsniveau annähernd den Zellanteil der LSEC an der Leber wider, was auf LSEC als die Hauptquelle der mRNA der untersuchten Zelladhäsionsmoleküle schließen lässt. Wie

erwartet, wurden die Zelladhäsionsmoleküle also überwiegend in den LSEC exprimiert. Ähnlich wurde in LSEC aus DSS behandelten Mäusen eine signifikant erhöhte und gegenüber den Leberproben deutlich gesteigerte Expression von TNF- α nachgewiesen, was LSEC als eine überraschende Quelle von TNF- α ausweist. Auch für CXCL10 wurde in LSEC eine ca. 10-fach höhere Transkriptmenge gegenüber der Gesamtleber nachgewiesen, allerdings findet sich kein Unterschied zwischen DSS-behandelten und Kontrolltieren. Demgegenüber ergab sich für die anderen untersuchten Zytokine ein anderes Bild. So deutet die schwache Expression von CCL25 und IL-18 (Kontrolle: $4,2 \pm 1,6$; DSS: $3,9 \pm 1,4$) auf einen anderen Zelltyp als Hauptproduzenten dieser Zytokine in der Leber hin.

3.5.4 Dendritische Zellen

Angesichts der Schlüsselrolle von DC für die Balance von Immunität und Toleranz wurde der Phänotyp der Leber-DC in Mäusen mit chronischer DSS-Kolitis durchflusszytometrisch analysiert. Die auf reifen DC vorkommenden co-stimulatorischen Moleküle CD40 und CD80 waren auf DC aus der Leber von Mäusen mit chronischer Kolitis im Vergleich zu Kontrollmäusen hochreguliert (Abb. 8D), während keine Änderung für CD86 (Kontrolle $9,4 \pm 1,3\%$; DSS $11,3 \pm 3,6\%$) beobachtet wurde.

3.5.5 Portalvenöse Zytokine

Diese Aktivierung und Reifung der Leber DC könnte durch inflammatorische Zytokine, welche im entzündeten Darm freigesetzt werden und zusammen mit bakteriellen Bestandteilen über die Pfortader die Leber erreichen, verursacht werden (Gabele *et al.*, 2011). Daher wurde aus der Pfortader Blut entnommen und die Konzentration ausgewählter Zytokine im Plasma mittels CBA (*Cytometric Bead Array*) *Multiplex Assay* analysiert. Die Konzentrationen von TNF- α , IFN- γ , IL-6 und CCL2 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*, MCP-1) waren signifikant in Mäusen mit DSS-Kolitis erhöht, während IL-10 in 6/12 (MW $15,0 \pm 17,7$ pg/ml) der DSS behandelten aber nur in 1/9 der unbehandelten Kontrollen (6,8 pg/ml) detektierbar war (Abb. 8E).

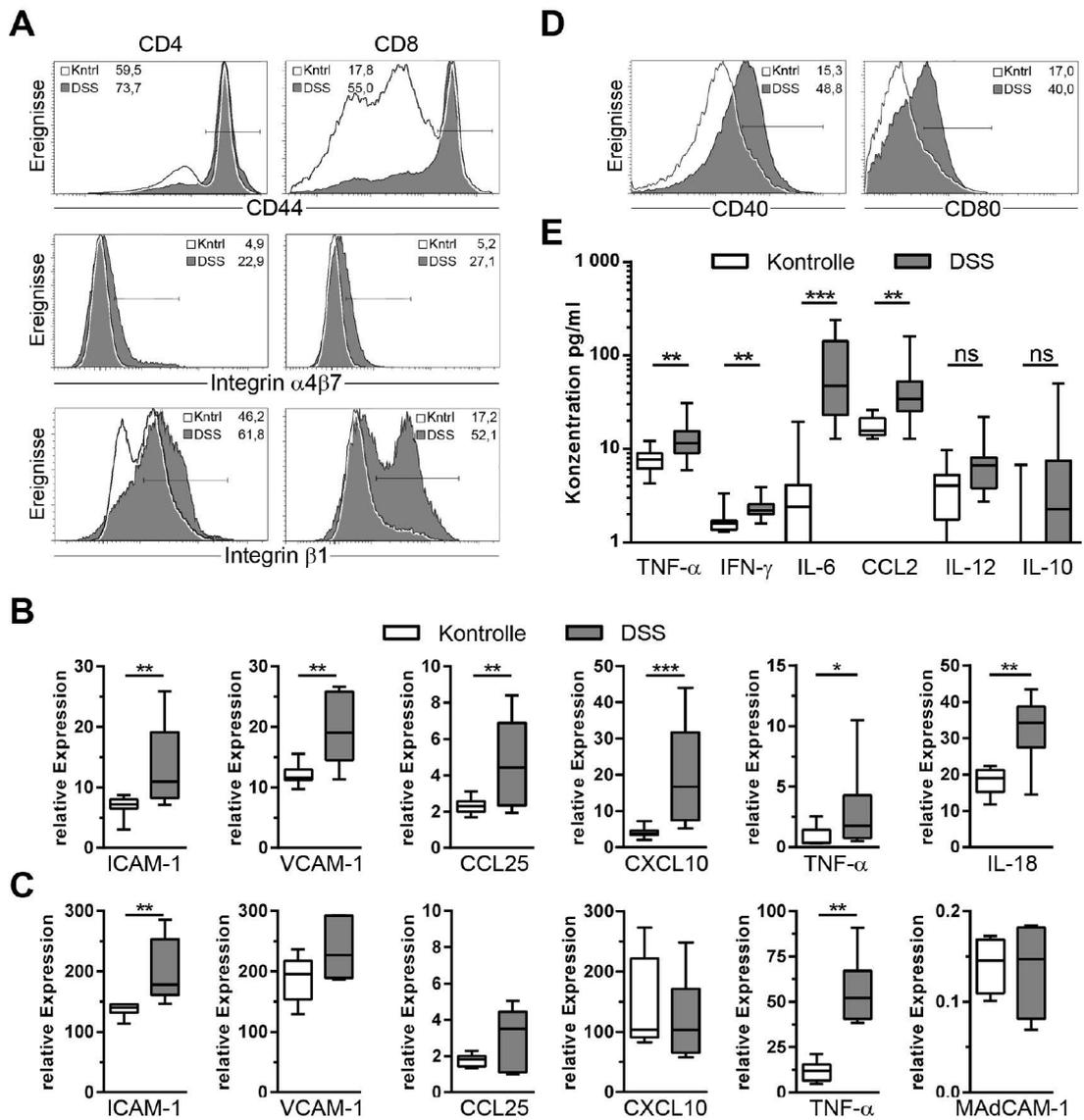


Abb. 8: Chronische Kolitis führt zu einem pro-inflammatorischen Milieu in der Leber

Eine chronische Kolitis wurde in Wildtyp-B6 Mäusen durch die wiederholte Gabe von DSS im Trinkwasser ausgelöst. Am Tag 63 wurden die nicht-parenchymalen Zellen aus der Leber isoliert und die Expression von Oberflächenmolekülen durchflusszytometrisch bestimmt. (A) Expression von CD44, Integrin $\alpha 4\beta 7$ und Integrin $\beta 1$ auf CD4 bzw. CD8 T-Zellen (auf Lymphozyten anhand des FSC/SSC und CD4 bzw. CD8 eingegrenzt) und (D) Expression von CD40 und CD80 auf dendritischen Zellen ($CD11c^{high}$). Representative Histogramme aus zwei Experimenten ($n=6$), der Anteil der Zellen in der jeweiligen Region ist oben abgebildet. (B) Am Tag 63 wurden mittels Realtime RT-PCR Leberproben ($n \geq 8$) oder (C) isolierte sinusoidale Leberendothelzellen ($n=6$) auf die Expression von ICAM-1, VCAM-1, MAcCAM-1, CCL25, CXCL10, TNF- α und IL-18 relativ zum *Housekeeping-Gen* RPL4 untersucht. (E) Am Tag 63 wurde die Portalvene punktiert und ausgewählte Zytokine im Blutplasma mittels CBA (*Cytometric Bead Array*) Multiplex Assay quantifiziert ($n \geq 8$). Mann-Whitney-U-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Zusammenfassend führte eine chronische Kolitis *per se* zu Veränderungen im lokalen immunologischen Umfeld der Leber, das durch eine erhöhte Expression von

Adhäsionsmolekülen, einer Aktivierung und Reifung von DC und einer Akkumulation von aktivierten T-Zellen gekennzeichnet war.

3.6 Chronische Kolitis fördert die Induktion einer immunvermittelten Cholangitis

3.6.1 T-Zell-Aktivierung

Um zu prüfen, ob diese Änderungen im lokalen immunologischen Umfeld der Leber ausreichen, um die Entstehung einer immunvermittelten Cholangitis in Mäusen zu begünstigen, wurde eine chronische DSS-Kolitis in ASBT-OVA Mäusen induziert, und nach 9 Wochen wurden naive OT-I T-Zellen transferiert. Am Tag 2 nach dem Transfer CFSE-markierter OT-I Zellen zeigte sich in der Leber von ASBT-OVA Mäusen, die unter einer chronischen DSS-Kolitis litten, eine deutlich verstärkte Proliferation gegenüber den gesunden ASBT-OVA Kontrollen, während keine Proliferation in Wildtyp-B6 Mäusen nachgewiesen wurde, egal ob sie an einer chronischen Kolitis erkrankt waren oder nicht (Abb. 9A). Dies führte am Tag 4 nach dem Transfer zu einer Verdopplung der Anzahl CD90.1⁺ OT-I T-Zellen in der Leber von DSS-behandelten ASBT-OVA Mäusen (Abb. 9D). Dabei wiesen die aus gesunden und DSS-behandelten ASBT-OVA Mäusen re-isolierten OT-I T-Zellen eine ähnliche Effektorfunktion auf und produzierten nach Restimulation mit dem Peptidantigen OVA₂₅₇₋₂₆₄ *in vitro* etwa gleich viel IFN- γ (Daten nicht gezeigt).

3.6.2 Histologie und Plasma-ALT

Anhand (immun-) histologischer Färbungen und der ALT-Konzentration im Blut wurde untersucht, ob die in den Lebern von an einer Kolitis leidenden Mäusen aktivierten OT-I T-Zellen dort auch eine Entzündung auslösen. Die histologische Auswertung der H/E-Färbungen von Leberschnitten zeigte nur in DSS-behandelten ASBT-OVA Mäusen mononukleäre Infiltrate in den Portalfeldern und vereinzelte lobuläre Infiltrate (Abb. 9B), welche aus CD3⁺ T-Zellen bestanden, während in unbehandelten ASBT-OVA und DSS-behandelten B6-Wildtyp Mäusen keine periduktulären Infiltrate auftraten. Entsprechend wurde in ASBT-OVA Mäusen, die unter einer chronischen Kolitis litten, ein signifikanter Anstieg der

Plasma-ALT-Konzentration beobachtet, jedoch nicht in gesunden ASBT-OVA Mäusen oder in B6-Wildtyp Mäusen mit Kolitis (Abb. 9C).

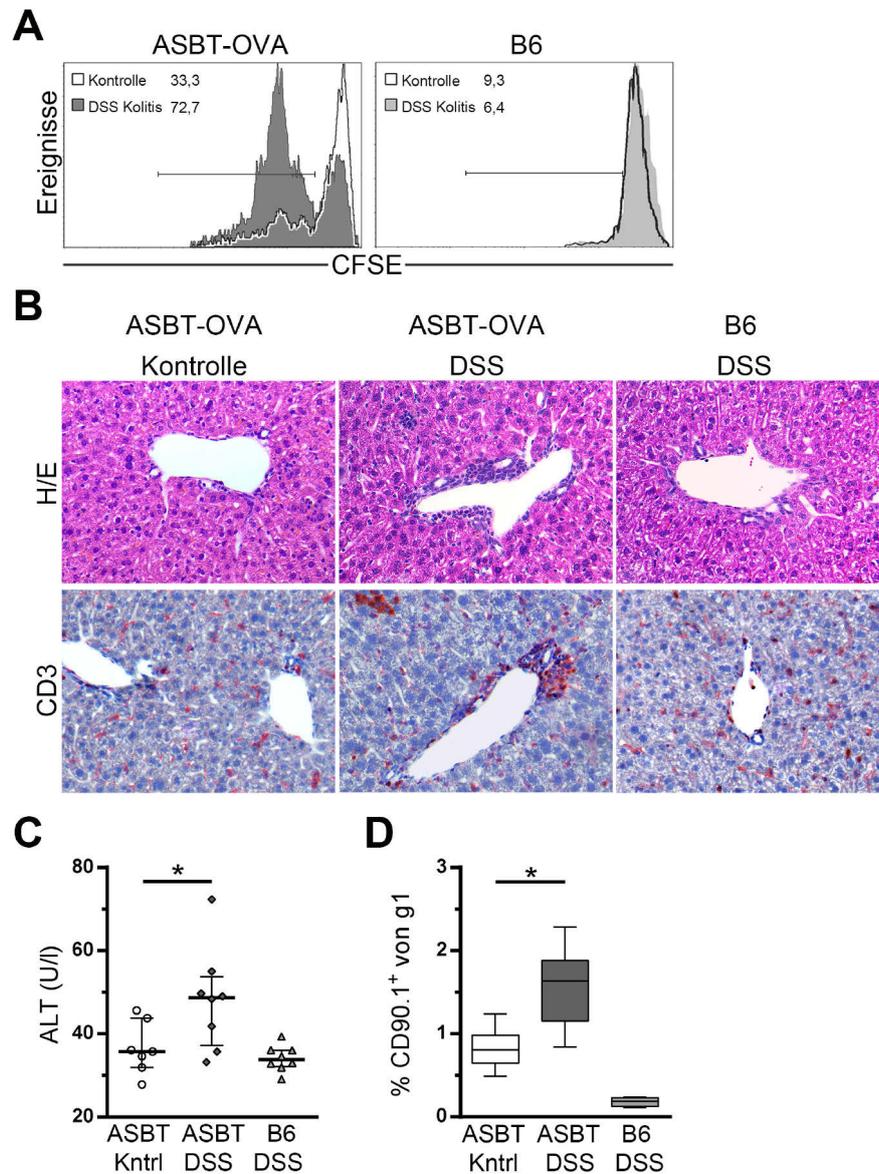


Abb. 9: Chronische Kolitis fördert die Induktion einer immunvermittelten Cholangitis

Eine chronische Kolitis wurde in ASBT-OVA und Wildtyp-B6 Mäusen durch die wiederholte Gabe von DSS im Trinkwasser ausgelöst, und am Tag 63 wurden naive OT-I T-Zellen *i.v.* transferriert. (A) Zwei Tage nach dem Transfer CFSE-markierter OT-I T-Zellen wurde die Proliferation durchflusszytometrisch bestimmt. Repräsentative Histogramme bezogen auf CD90.1⁺ OT-I Zellen von zwei Experimenten (n=6) werden gezeigt. Der Prozentsatz der proliferierenden Zellen ist oben links dargestellt. (B) H/E-Färbung und CD3 Immunhistochemie von Leberbiopsien aus ASBT-OVA Mäusen, DSS-behandelten ASBT-OVA Mäusen und DSS-behandelten Wildtyp-B6 Mäusen am Tag 7 nach dem T-Zell-Transfer (n=6); Vergrößerung 200x. (C) ALT-Konzentration im Plasma am Tag 4, aus zwei Experimenten zusammengefasst (n=8). (D) Am Tag 4 nach dem Transfer wurden nicht-parenchymale Zellen aus der Leber isoliert und der Anteil CD90.1 positiver OT-I T-Zellen an den Gesamtlymphozyten (FFC/SSC) durchflusszytometrisch bestimmt; aus zwei Experimenten zusammengefasste Daten (n=6). Mann-Whitney-U-Test * p < 0,05.

Zusammenfassend führte eine chronische Kolitis zu pro-inflammatorischen Veränderungen im lokalen immunologischen Umfeld der Leber, die ausreichen, um eine immunvermittelte Cholangitis in Mäusen auszulösen.

3.7 Im Dünndarm aktivierte CD8 T-Zellen lösen eine immunvermittelte Cholangitis aus

3.7.1 IFABP-OVA und IFABP×ASBT-OVA Mäuse

Um die mit dem OVA-Kolitis Modell gewonnenen Ergebnisse zu verifizieren, wurde ein weiteres transgenes Maus-Modell herangezogen. In IFABP-OVA Mäusen wird unter dem IFABP- (*Intestinal Fatty Acid Binding Protein*) Promotor eine verkürzte Form von OVA in Dünndarmepithelzellen als endogenes Antigen exprimiert. Das endogene Antigen wird im GALT präsentiert und führt zur Aktivierung von adoptiv transferierten OT-I T-Zellen (Vezys *et al.*, 2000). Diese IFABP-OVA Mäuse wurden mit ASBT-OVA Mäusen gekreuzt, so dass die Nachkommen (IFABP×ASBT-OVA) das Modellantigen OVA sowohl im Darm als auch in den Gallengängen der Leber exprimieren. Damit ergibt sich eine Situation, in der CD8 T-Zellen im GALT durch endogenes Antigen aktiviert werden und auf das gleiche endogene Antigen in den Gallengängen der Leber treffen. Dies ermöglichte zu untersuchen, ob CD8 T-Zellen, die ein gemeinsames Antigen in Darm und Leber erkennen, möglicherweise die Entwicklung einer immunvermittelten Cholangitis auslösen.

3.7.2 Proliferation

Zunächst wurde vergleichend in ASBT-OVA, IFABP-OVA und IFABP×ASBT-OVA analysiert, welchen Einfluss der Ort der endogenen Antigenexpression auf die funktionelle Kapazität von adoptiv transferierten OT-I T-Zellen hat. Dazu wurden den transgenen Mäusen naive OT-I T-Zellen *i.v.* injiziert, und am Tag 2 nach dem Transfer wurde die Proliferation der OT-I T-Zellen anhand der CFSE-Färbung durchflusszytometrisch untersucht. Wie erwartet, erkannten die OT-I T-Zellen das endogene Antigen in allen transgenen Mäusen und begannen zu proliferieren. Dabei wiesen OT-I T-Zellen aus IFABP-OVA bzw. IFABP×ASBT-OVA eine höhere Proliferationsrate auf, als OT-I T-Zellen aus ASBT-OVA Mäusen (Abb. 10A).

Gleichzeitig wurde die Verteilung der CFSE⁺ Zellen analysiert. Entsprechend der unterschiedlichen lokalen Antigenexpression zeigte sich in IFABP-OVA Mäusen der größte Anteil von OT-I T-Zellen in den mLN, während in ASBT-OVA Mäusen die Mehrheit der OT-I T-Zellen in der Leber und im Leberlymphknoten (1,23%±0,13%) vorkam. Das Vorhandensein des gleichen endogenen Antigens in Darm und Leber in IFABP×ASBT-OVA Mäusen führte im Vergleich zu IFABP-OVA Mäusen zu einer signifikanten Verringerung in den mLN und zu einer gesteigerten Akkumulation von OT-I T-Zellen in der Leber (Abb. 10B).

3.7.3 Effektorzytokine

Die stärkere Aktivierung im Darm spiegelte sich auch in der Produktion des Effektor-Zytokins IFN- γ wider. Die große Mehrheit der am Tag 7 nach dem Transfer isolierten OT-I T-Zellen aus IFABP-OVA Mäusen produzierten IFN- γ nach Restimulation mit dem nominalen Peptidantigen OVA₂₅₇₋₂₆₄ in Milz, mLN und Leber (Abb. 10C). Der größte Anteil mit ca. 70% IFN- γ ⁺ OT-I T-Zellen fand sich dabei in der Leber von IFABP-OVA Mäusen. OT-I T-Zellen aus doppelt transgenen IFABP×ASBT-OVA Mäusen waren auf Einzelzellebene zu einem etwas geringeren Anteil IFN- γ ⁺, insbesondere in den mLN und in der Leber. Demgegenüber produzierte - wie weiter oben bereits erwähnt - nur eine Minderheit der aus ASBT-OVA Mäusen isolierten OT-I T-Zellen IFN- γ (Abb. 10C links). Um die effektive Zahl und Verteilung der IFN- γ produzierenden T-Zellen besser erfassen zu können, wurden die Zahl der IFN- γ ⁺ OT-I T-Zellen zusätzlich in Bezug zu den Gesamtlymphozyten betrachtet (Abb. 10C rechts). So zeigte sich in IFABP×ASBT-OVA gegenüber IFABP-OVA Mäusen eine deutlich verminderte Zahl IFN- γ produzierender OT-I T-Zellen in der Milz (5x) und den mesenterialen Lymphknoten (>10x), während in der Leber eine vergleichbar hohe Zahl von Effektorzellen erfasst wurde. Dies deutet auf eine Antigen-abhängige Retention der aktivierten OT-I T-Zellen in der Leber von IFABP×ASBT-OVA Mäusen hin, ähnlich wie für das OVA-Kolitis Modell in ASBT-OVA Mäusen in Abschnitt 3.3 beschrieben. Beachtenswert ist zudem die drastische Zunahme IFN- γ produzierender OT-I T-Zellen um mehr als eine log-Stufe in der Leber von IFABP×ASBT-OVA und IFABP-OVA Mäusen gegenüber ASBT-OVA Mäusen durch die transgene Expression des Modellantigens im Darm.

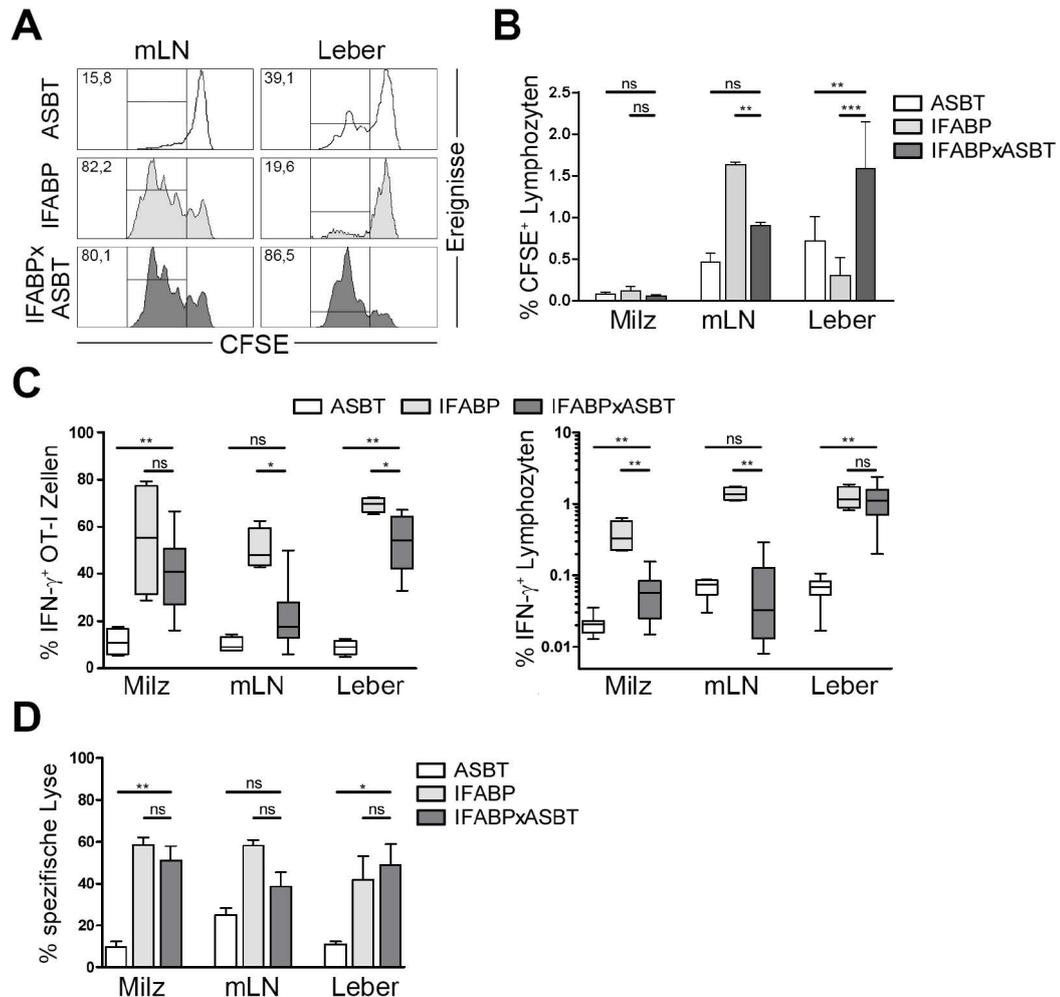


Abb. 10: Aktivierung von CD8 T-Zellen durch endogenes Antigen in Darm und Leber.

Naive OT-I T-Zellen wurden *i.v.* in ASBT-OVA, IFABP-OVA oder IFABP x ASBT-OVA Mäuse transferiert. (A) Die Proliferation von OT-I T-Zellen wurde mittels CFSE-Färbung durchflusszytometrisch am Tag zwei bestimmt. Repräsentative Plots bezogen auf CD90.1⁺ OT-I Zellen von zwei Experimenten (n≥5) werden gezeigt. Der Prozentsatz der proliferierenden Zellen ist oben links dargestellt. (B) Der Anteil CFSE⁺ Zellen bezogen auf die Gesamtlymphozyten (FSC/SSC) wurde am Tag zwei bestimmt, zusammengefasst aus zwei Experimenten (n≥5). (C) Die Produktion von IFN-γ nach Stimulation mit OVA₂₅₇₋₂₆₄ wurde für Zellen aus der Milz, mesenterialen Lymphknoten (mLN) und Leber am Tag 7 analysiert. Der Box-Plot zeigt den prozentualen Anteil IFN-γ⁺ Zellen *links*: bezogen auf CD90.1⁺ OT-I Zellen; *rechts*: bezogen auf Gesamtlymphozyten basierend auf dem FSC/SSC, zusammengefasst aus zwei Experimenten (n≥5). (D) Die zytolytische Kapazität der OT-I T-Zellen wurde mittels *in vivo* Zytolyse-Assay an Tag 7 bestimmt. Die Daten wurden aus zwei Experimenten zusammengefasst (n≥5). Mann-Whitney-U-Test * p<0,05, ** p<0,01, ns nicht signifikant (p>0,05).

3.7.4 Zytotoxizität

Des Weiteren wurde die zytolytische Kapazität der OT-I T-Zellen mittels *in vivo* Zytolyse-Assay untersucht. In IFABP x ASBT-OVA und IFABP-OVA Mäusen zeigte sich gegenüber ASBT-OVA Mäusen eine signifikante Erhöhung der spezifischen Lyse-rate in Milz und Leber, während in den mLN keine signifikanten Unterschiede zwischen

IFABP×ASBT-OVA und den einfach-transgenen Parentalstämmen IFABP-OVA bzw. ASBT-OVA zu verzeichnen waren. Interessanterweise konnte in IFABP-OVA und IFABP-ASBT-OVA Mäusen in der Leber eine spezifische Zytolyse der mit dem nominalen Peptidantigen OVA₂₅₇₋₂₆₄ beladenen Zielzellen beobachtet werden, was beim OVA-Kolitis Modell in Wildtyp-B6 und ASBT-OVA Mäusen nicht der Fall war (Abb. 10D). Hier wird ein wichtiger Unterschied zwischen den Modellen deutlich. Während im OVA-Kolitis Modell das Antigen nur transient im Kolon vorhanden ist und rasch degradiert wird, ermöglichte die kontinuierliche transgene Expression des Antigens in Enterozyten einen wiederholten Kontakt der transferierten OT-I T-Zellen mit dem Antigen. Trotz der unterschiedlichen Menge des verfügbaren Antigens führt die Aktivierung im GALT zu einer Expansion der OT-I T-Zellen und zu einer Akkumulation in der Leber von IFABP×ASBT-OVA und IFABP-OVA Mäusen.

3.7.5 Histologie

Anhand (immun-) histologischer Färbungen und der ins Blut freigesetzten ALT-Menge wurde untersucht, ob diese erhöhte Zahl zytolytisch aktiver Effektorzellen in der Leber eine Entzündung auslöst. Die histologische Auswertung der H/E-Färbungen von Leberschnitten aus IFABP-OVA und IFABP×ASBT-OVA Mäusen zeigte vereinzelt lobuläre Infiltrate und diffus im Parenchym verteilte mononukleäre Zellen in beiden Mausstämmen, während ausschließlich in IFABP×ASBT-OVA Mäusen Infiltrate in den Portalfeldern vorhanden waren (Abb. 11A). Diese Infiltrate konnten mittels immunhistologischer Färbungen für CK19 und CD3 als periduktuläre T-Zellen spezifiziert werden. Demgegenüber war in ASBT-OVA Mäusen 7 Tage nach dem adoptiven Transfer von OT-I T-Zellen histologisch keine Veränderung im Vergleich zu naiven ASBT-OVA Mäusen feststellbar.

3.7.6 Plasma-Alaninaminotransferase

Um den zeitlichen Verlauf der Entzündung zu erfassen, wurde den Mäusen zu Beginn und nach 4, 7, 10 und 14 Tagen Blut entnommen und die Höhe der Plasma-ALT Konzentration bestimmt. Während es in ASBT-OVA und IFABP-OVA Mäusen zu einer leichten Erhöhung (<2x) des ALT-Wertes kam, zeigte sich in IFABP×ASBT-OVA Mäusen ein transientser Anstieg des ALT-Wertes (5x) mit Höhepunkt am Tag 7

nach dem OT-I T-Zell-Transfer, der bis zum Tag 14 langsam wieder auf das Ausgangsniveau abfiel (Abb. 11B). Zur übersichtlichen statistischen Analyse wurde die ALT-Konzentration im Plasma am Tag 7 zusätzlich in einem Dot-Plot-Diagramm dargestellt. Die ALT-Konzentration war in IFABP \times ASBT-OVA Mäusen gegenüber den einfach-transgenen Parentalstämmen IFABP-OVA und ASBT-OVA signifikant erhöht (Abb. 11C).

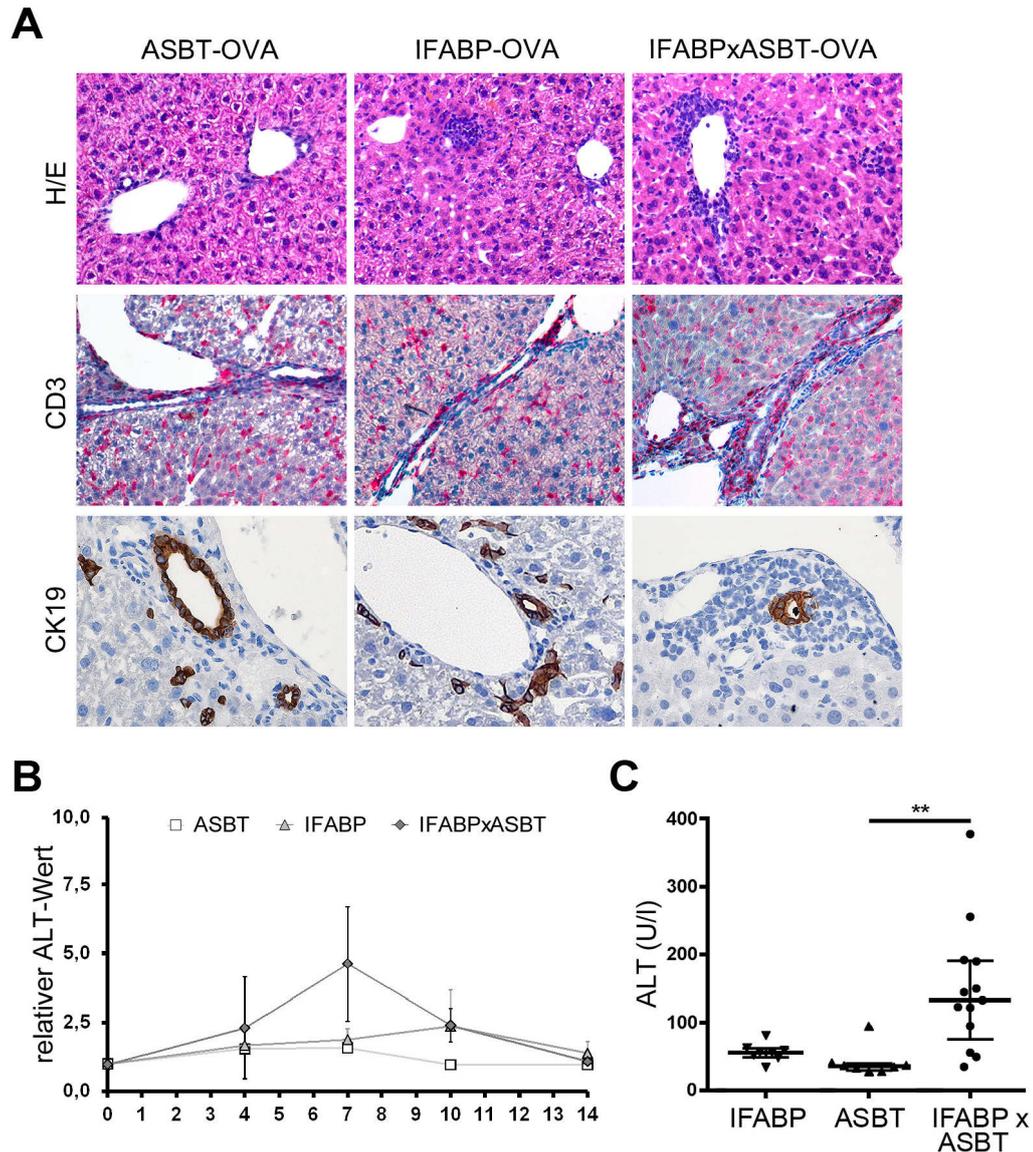


Abb. 11: Endogenes Antigen in Darm und Leber führt zu immunvermittelter Cholangitis

Naive OT-I T-Zellen wurden *i.v.* in IFABP-OVA, ASBT-OVA oder IFABP \times ASBT-OVA Mäuse transferiert. (A) H/E-Färbung, CD3 und CK19 Immunhistochemie von Leberbiopsien aus IFABP-OVA, ASBT-OVA oder IFABP \times ASBT-OVA Mäusen am Tag 7 (n=6); Vergrößerung 200x. (B) Mittlere relative Plasma-ALT-Werte bezogen auf den Ausgangswert im zeitlichen Verlauf nach dem OT-I T-Zell-Transfer, (n \geq 7). (C) ALT-Konzentration im Plasma am Tag 7, (n \geq 7). Daten zusammengefasst aus zwei Experimenten. Mann-Whitney-U-Test ** p < 0,01

3.7.7 Makrophagen und B-Zellen

Um eine mögliche Beteiligung endogener Lymphozyten an der durch CD8 T-Zellen ausgelösten immunvermittelten Cholangitis zu charakterisieren, wurde immunhistologisch untersucht, ob Makrophagen (F4/80⁺) oder B-Zellen (B220⁺) in den lobulären Infiltraten vorkommen. Es zeigte sich eine sehr unterschiedliche Verteilung der verschiedenen untersuchten Zelltypen in der Leber. Während F4/80⁺ Makrophagen (Kupffer-Zellen) im gesamten Parenchym der Leber zu finden waren, jedoch nicht gehäuft an den Gallengängen auftraten, waren nur wenige B220⁺ B-Zellen in den Lebern detektierbar und kamen vermehrt in den Infiltraten in IFABP×ASBT-OVA Mäusen vor (Abb. 12). Von den untersuchten Zelltypen waren also nur B220⁺ Zellen an den inflammatorischen Infiltraten beteiligt.

3.7.8 Regulatorische T-Zellen

Trotz der kontinuierlichen transgenen Expression des Autoantigens im Darm und in den Gallengängen der Leber und der nachgewiesenen Differenzierung adoptiv transferierter OT-I T-Zellen zu potenten Effektorzellen, verlief die Entzündungsreaktion in den Gallengängen selbstlimitiert und ging bis zum Tag 14 kontinuierlich zurück. Die Ausbildung einer immunvermittelten chronischen Cholangitis könnte eventuell durch regulatorische T-Zellen effektiv unterdrückt worden sein. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Expression des für regulatorische T-Zellen typischen Transkriptionsfaktors FoxP3 (*Forkhead-Box-Protein P3*) immunhistologisch auf Leberschnitten aus IFABP×ASBT-OVA Mäusen sowie aus den Parentalstämmen ASBT-OVA und IFABP-OVA untersucht. Während in den Lebern von ASBT-OVA Mäusen nur vereinzelt FoxP3⁺ Zellen vorhanden waren, wurden deutlich mehr diffus im Parenchym verteilte FoxP3⁺ Zellen in IFABP-OVA und IFABP×ASBT-OVA Mäusen nachgewiesen. Dabei kam es ausschließlich in IFABP×ASBT-OVA Mäusen zu einer Co-Lokalisation FoxP3⁺ Zellen in den portalen T-Zell-Infiltraten (Abb. 12).

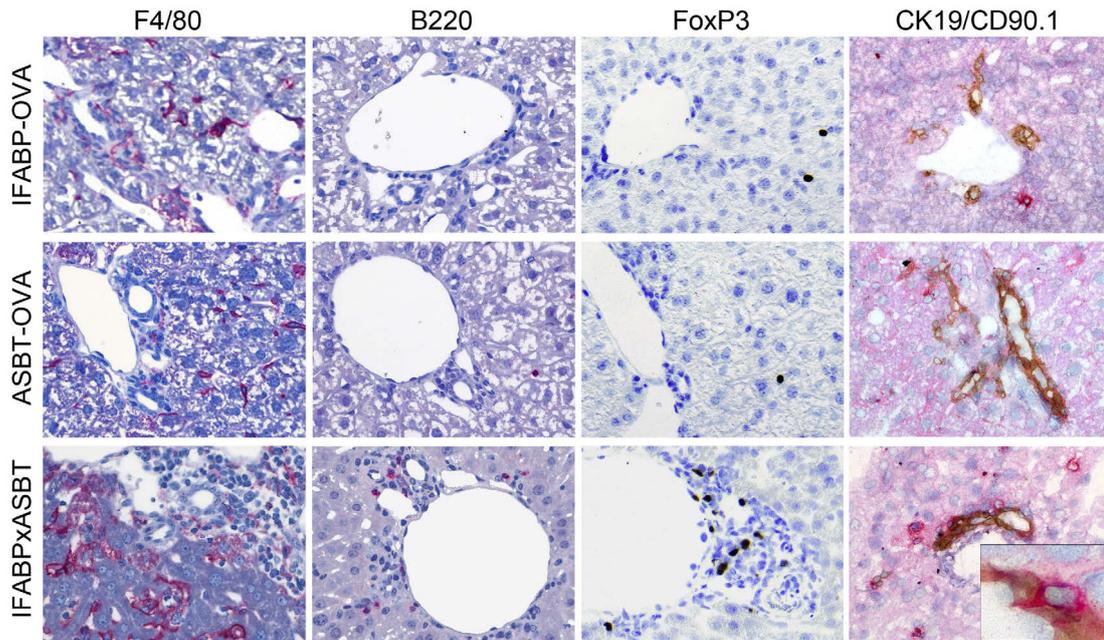


Abb. 12: Immunhistologie für F4/80, B220, FoxP3 und CK19/CD90.1

Naive OT-I T-Zellen wurden *i.v.* in IFABP-OVA, ASBT-OVA oder IFABP×ASBT-OVA Mäuse transferiert und am Tag 7 Leberbiopsien immunhistochemisch für F4/80, B220, FoxP3 sowie CK19/CD90.1 gefärbt. Repräsentative Bilder aus zwei Experimenten ($n = 6$); Vergrößerung 200x, Ausschnitt unten rechts 800x.

Zusammenfassend führte das Vorhandensein eines gemeinsamen Antigens im Darm und in den Gallengängen der Leber dazu, dass CD8 T-Zellen überwiegend im GALT aktiviert wurden, in die Leber migrierten und dort die Entwicklung einer immunvermittelten Cholangitis auslösten. Diese ging mit der Akkumulation endogener B-Zellen und regulatorischen T-Zellen einher. Regulatorische T-Zellen waren möglicherweise an der Limitierung der Entzündungsreaktion beteiligt.

3.8 Infektion mit *Salmonella* im Darm begünstigt die Aktivierung von T-Zellen

In den bisher beschriebenen Modellen wurden CD8 T-Zellen im GALT entweder durch exogen appliziertes Antigen (OVA-Kolitis) oder durch transgen exprimiertes endogenes Antigen aktiviert und die Folgen für die Entstehung einer immunvermittelten Cholangitis untersucht, wenn das gleiche endogene Antigen in den Gallengängen der Leber exprimiert wird. Da verschiedene bakterielle und virale Infektionen des Gastrointestinaltraktes als mögliche Auslöser einer PSC beim Menschen diskutiert werden (Terjung und Spengler, 2009), sollte im transgenen Mausmodell geprüft werden, ob eine lokale bakterielle Infektion und der damit

einhergehende inflammatorische Kontext im Darm die Aktivierung von CD8 OT-I T-Zellen gegen endogenes Antigen unspezifisch verändern kann und so einen Einfluss auf die Entstehung einer immunvermittelten Cholangitis hat. Darüber hinaus sollte mit OVA-exprimierenden Bakterien untersucht werden, ob dieses bakterielle Antigen durch eine Antigen-spezifische Kreuzreaktion von OT-I T-Zellen gegen das gleiche endogene Antigen eine immunvermittelte Cholangitis auslösen kann.

3.8.1 Infektion mit Salmonella

Zuerst sollte die Konstellation untersucht werden, bei der im GALT ein zusätzlicher inflammatorischer Stimulus durch eine Infektion mit einem attenuierten *Salmonella*-Stamm bewirkt wird. *Salmonella typhimurium* ist ein intrazellulär replizierendes Bakterium, das nach oraler Infektion über die M-Zellen in die Peyerschen Plaques eindringt und vor allem Makrophagen und DC infiziert (Darji *et al.*, 1997). Hier wurde ein für aromatische Aminosäuren auxotropher *Salmonella typhimurium* Stamm (*aroA*⁻) verwendet, um gezielt einen lokalen inflammatorischen Kontext in Antigen-präsentierenden Zellen des GALT zu erzeugen und den Einfluss auf die Aktivierung von CD8 T-Zellen zu untersuchen. Dazu wurden doppelt transgene IFABP×ASBT-OVA Mäuse und die einfach-transgenen Parentalstämme ASBT-OVA und IFABP-OVA mit *Salmonella typhimurium* SL7207 (*Sm*) oder einem transformierten *Salmonella typhimurium* SL7207 Stamm (*SmOVA*), der eine verkürzte Form von Ovalbumin exprimiert, oral infiziert und zwei Tage später naive OT-I T-Zellen *i.v.* transferiert.

3.8.2 Salmonella-Nachweis

Es ist bekannt, dass eine orale Applikation des hier verwendeten attenuierten *Sm*-Stammes in Wildtyp-B6 Mäusen zu einer transienten Infektion des Dünndarms mit einer Invasion der Peyerschen Plaques führt, es kommt jedoch über den mLN hinaus nicht zu einer systemischen Ausbreitung der Bakterien (Mittrücker und Kaufmann, 2000). Dies war auch für die verwendeten transgenen Mausstämme ASBT-OVA, IFABP-OVA und IFABP×ASBT-OVA anzunehmen, welche den gleichen genetischen Hintergrund wie Wildtyp-B6 Mäuse besitzen. Die Ausdehnung der Infektion wurde mittels Ausstrichen auf Nährböden überprüft. Wie erwartet, konnten am Tag 1 und 2

nach der oralen Applikation keine Salmonellen in Ausstrichen von homogenisierten Organlysaten aus Milz und Leber nachgewiesen werden. In Fäzesproben wurden auf Xylose-Lysin-Desoxycholat (XLD)-Selektivnährböden nur am Tag 1 nach der Infektion im Mittel $0,7 \pm 0,4 \cdot 10^3$ Salmonellen pro mg nachgewiesen, am Tag 2 lag die Menge bereits unter der Nachweisgrenze von $1 \cdot 10^2$ CFU/mg. Dies galt auch für den transgenen Stamm *SmOVA*. Die Infektion mit den attenuierten *Salmonella*-Stämmen blieb also sowohl lokal als auch temporär beschränkt.

3.8.3 Proliferation

Zunächst wurde untersucht, welchen Einfluss eine vorausgehende orale Infektion mit *Sm* bzw. *SmOVA* auf die Proliferation adoptiv transferierter OT-I T-Zellen in IFABP \times ASBT-OVA Mäusen hat. Dazu wurden IFABP \times ASBT-OVA Mäuse mit *Sm* oder *SmOVA* oral infiziert, zwei Tage später naive CFSE-markierte OT-I T-Zellen *i.v.* transferiert und am Tag 4 durchflusszytometrisch untersucht. Es zeigte sich in den Peyerschen Plaques (Daten nicht gezeigt) und in den mLN aus *Sm*-infizierten Mäusen ein leicht erhöhter Anteil proliferierender OT-I T-Zellen, wobei aus der Leber isolierte OT-I T-Zellen eine niedrigere Fluoreszenzintensität aufwiesen, also vor allem fortgeschritten proliferierten T-Zellen entsprachen (Abb. 13A). Ähnlich zeigten OT-I T-Zellen auch nach einer Infektion mit *SmOVA* eine leicht verstärkte Proliferation in IFABP \times ASBT-OVA Mäusen (Abb. 14A).

3.8.4 Effektorzytokine

Ob sich der für die Proliferation naiver OT-I T-Zellen beobachtete leichte proinflammatorische Effekt einer vorhergehenden *Sm*-Infektion Antigen-unabhängig auch auf die Effektorfunktionen der OT-I T-Zellen erstreckte, wurde *ex vivo* anhand der Produktion von IFN- γ nach Restimulation mit dem nominalen Peptidantigen OVA₂₅₇₋₂₆₄ überprüft. In ASBT-OVA Mäusen kam es nach der Infektion mit *Sm* zu einem signifikanten Anstieg der IFN- γ produzierenden Zellen in Milz und mLN, jedoch nicht in der Leber. Dabei blieb der relative Anteil IFN- γ^+ OT-I T-Zellen unverändert niedrig (<20%), die Anzahl der OT-I T-Zellen bezüglich der Gesamtlymphozyten stieg jedoch signifikant an (Abb. 13B). In IFABP-OVA Mäusen führte eine vorangegangene *Sm*-Infektion im Gegensatz zu ASBT-OVA Mäusen nicht zu einem signifikanten

Anstieg der IFN- γ produzierenden OT-I T-Zellen. Zwar wurde in IFABP-OVA Mäusen durch die Infektion mit *Sm* der hohe Anteil IFN- γ produzierender OT-I T-Zellen tendenziell gesteigert (im Mittel waren in der Milz ca. doppelt so viele IFN- γ^+ OT-I T-Zellen vorhanden) der Effekt erreichte jedoch wie auch in mLN und Leber nicht das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ (Abb. 13B). In doppelt transgenen IFABP \times ASBT-OVA Mäusen stieg nach der Infektion mit *Sm* der Anteil IFN- γ^+ OT-I T-Zellen insbesondere in den mLN deutlich an (8x). Dabei stieg der relative Anteil IFN- γ^+ OT-I T-Zellen in den mLN von IFABP \times ASBT-OVA Mäusen vom niedrigen Ausgangswert ähnlich wie in ASBT-OVA Mäusen (<20%), auf einen den Werten von IFABP-OVA Mäusen vergleichbaren Wert (>50%). Auch in Milz und Leber von IFABP \times ASBT-OVA Mäusen war eine tendenzielle Zunahme von IFN- γ produzierenden OT-I T-Zellen zu verzeichnen (Abb. 13B). Die Stärke der Zunahme variierte zwischen den einzelnen Tieren jedoch recht stark, wodurch große Interquartilsabstände resultierten. Eine transiente *Sm*-Infektion im Darm begünstigte also Antigen-unabhängig die Aktivierung von OT-I T-Zellen im GALT und führte zu einer vermehrten Zahl IFN- γ^+ Effektorzellen.

3.8.5 Zytotoxizität

Ergänzend zur IFN- γ Produktion wurde der Einfluss einer vorangegangenen *Sm*-Infektion auf die Effektorfunktion auch anhand der zytolytischen Kapazität der OT-I T-Zellen mittels *in vivo* Zytolyse-Assay untersucht. Parallel zum oben beschriebenen Anstieg der IFN- γ^+ Effektorzellen, kam es in ASBT-OVA Mäusen nach der Infektion mit *Sm* zu einer signifikanten Erhöhung der spezifischen Lyserate in Milz und mLN, während in der Leber die spezifische Lyserate unverändert niedrig blieb (Abb. 13C). Ähnlich zeigten IFABP \times ASBT-OVA Mäuse nach der Infektion mit *Sm* eine signifikant erhöhte spezifische Lyserate in mLN und interessanterweise auch in der Leber (Abb. 13C). Bei IFABP-OVA Mäusen stieg nach der Infektion mit *Sm* die ohnehin schon sehr hohe spezifische Lyserate nicht weiter an, wie es bei dem beobachteten konstant hohen Anteil IFN- γ produzierender OT-I T-Zellen zu erwarten war. Eine transiente *Sm*-Infektion im Darm förderte also Antigen-unspezifisch die Differenzierung von OT-I T-Zellen zu Effektorzellen mit Antigen-spezifischer zytolytischer Kapazität.

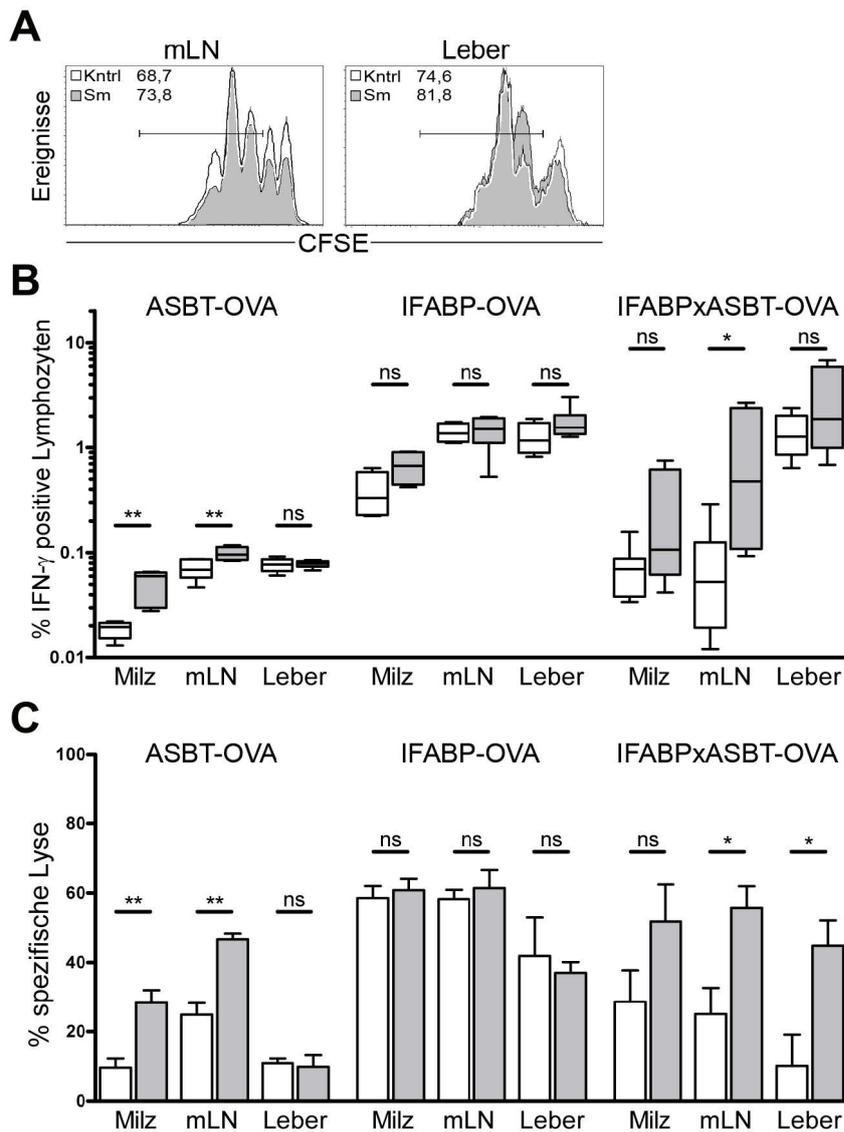


Abb. 13: Effektorfunktionen nach *Salmonella*-Infektion

ASBT-OVA, IFABP-OVA und IFABP \times ASBT-OVA Mäuse wurden mit *Salmonella typhimurium* SL7207 (Sm) oral infiziert und zwei Tage später naive OT-I T-Zellen *i.v.* transferiert. (A) Die Proliferation von OT-I T-Zellen wurde mittels CFSE-Färbung durchflusszytometrisch am Tag 2 nach dem T-Zell-Transfer bestimmt. Repräsentative Histogramme von Lymphozyten aus der Milz, mesenterialen Lymphknoten (mLN) und Leber bezogen auf CD90.1⁺ OT-I Zellen von zwei Experimenten (n=6) sind abgebildet. Der Prozentsatz der proliferierenden Zellen ist oben links dargestellt. (B) Die Produktion von IFN- γ nach Stimulation mit OVA₂₅₇₋₂₆₄ wurde für Zellen aus der Milz, mLN und Leber am Tag 7 nach dem T-Zell-Transfer analysiert. Der logarithmisch dargestellte Box-Plot zeigt den prozentualen Anteil IFN- γ ⁺ OT-I T-Zellen bezogen auf Lymphozyten (FSC/SSC), zusammengefasst aus zwei Experimenten (n=6). (C) Die zytolytische Kapazität der OT-I T-Zellen wurde mittels *in vivo* Zytolyse-Assay an Tag 7 nach dem T-Zell-Transfer bestimmt. Die Daten wurden aus zwei Experimenten zusammengefasst (n=6). Mann-Whitney-U-Test * p<0,05, ** p<0,01, ns nicht signifikant, p>0,05.

3.8.6 Infektion mit Salmonella-OVA

Nun wurde untersucht, ob durch eine vorangehende Infektion mit *SmOVA* das bakterielle Antigen eine Antigen-spezifische Kreuzreaktion von OT-I T-Zellen gegen das gleiche endogene Antigen ausgelöst wird. Nach Infektion mit *SmOVA* konnte in ASBT-OVA Mäusen keine signifikante Veränderung in der IFN- γ Produktion von OT-I T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 14B). Demgegenüber stieg in IFABP-OVA-Mäusen nach einer Infektion mit *SmOVA* der Anteil IFN- γ produzierender OT-I T-Zellen in Milz, mLN und Leber signifikant an, in der Milz verdreifachte sich die Zahl IFN- γ^+ OT-I T-Zellen. Einen ähnlichen Effekt hatte die vorausgehende Infektion mit *SmOVA* auch in IFABPxASBT-OVA Mäusen. Der Anteil IFN- γ positiver OT-I T-Zellen in Milz, mLN und Leber stieg signifikant an, die Zahl IFN- γ produzierender OT-I T-Zellen im Verhältnis zur Gesamtlymphozyten-Population vervielfachte sich in allen untersuchten Organen (Abb. 14B). Interessanterweise trat eine verstärkte Aktivierung von OT-I T-Zellen durch eine vorangegangene *SmOVA* Infektion nur in IFABP-OVA und IFABPxASBT-OVA auf, also wenn im GALT gleichzeitig das endogene Antigen und das gleiche bakterielle Antigen vorhanden waren.

3.8.7 Zytotoxizität

Demnach wäre nach einer Infektion mit *SmOVA* auch eine Steigerung der zytolytischen Kapazität der OT-I Effektorzellen zu erwarten. Tatsächlich wurde in ASBT-OVA Mäusen nach der Infektion mit *SmOVA* eine signifikante Erhöhung der spezifischen Lyserate in Milz und mLN beobachtet, wobei in der Leber die spezifische Lyserate unverändert niedrig war (Abb. 14C). In IFABP-OVA Mäusen blieb, wie nach der oben beschriebenen *Sm*-Infektion, auch nach der Infektion mit *SmOVA* die spezifische Lyserate konstant hoch und zeigte keine weitere Steigerung. In IFABPxASBT-OVA Mäusen zeigte sich parallel zum beschriebenen deutlichen Anstieg IFN- γ produzierender Effektorzellen nach der Infektion mit *SmOVA* eine signifikant erhöhte spezifische Lyserate in Milz, mLN und in der Leber (Abb. 14C).

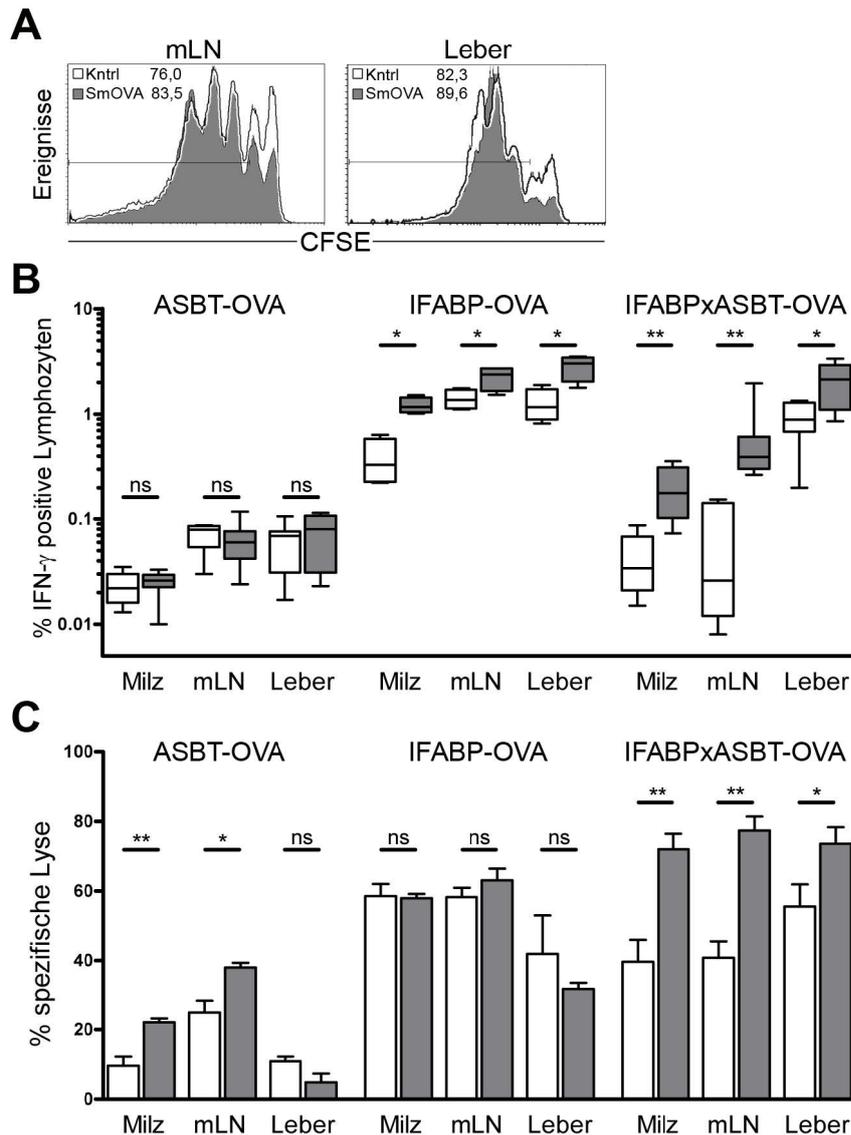


Abb. 14: Effektorfunktion nach *Salmonella*-OVA-Infektion

ASBT-OVA, IFABP-OVA und IFABPxASBT-OVA Mäuse wurden mit *Salmonella*-OVA (SmOVA) oral infiziert und zwei Tage später naive OT-I T-Zellen *i.v.* transferiert. (A) Die Proliferation von CFSE-markierten OT-I T-Zellen wurde durchflusszytometrisch am Tag 2 nach dem T-Zell-Transfer bestimmt. Repräsentative Histogramme von Lymphozyten aus dem mesenterialen Lymphknoten (mLN) und der Leber von IFABPxASBT-OVA Mäusen bezogen auf CD90.1⁺ OT-I Zellen von zwei Experimenten (n=6) sind abgebildet. Der Prozentsatz der proliferierenden Zellen ist oben links dargestellt. (B) Die Produktion von IFN- γ nach Stimulation mit OVA₂₅₇₋₂₆₄ wurde für Zellen aus der Milz, mLN und Leber am Tag 7 nach T-Zell-Transfer analysiert. Der logarithmisch dargestellte Box-Plot zeigt den prozentualen Anteil IFN- γ ⁺ OT-I T-Zellen bezogen auf Lymphozyten (FSC/SSC), zusammengefasst aus zwei Experimenten (n=6). (C) Die zytolytische Kapazität der OT-I T-Zellen wurde mittels *in vivo* Zytolyse-Assay an Tag 7 nach dem T-Zell-Transfer bestimmt. Die Daten wurden aus zwei Experimenten zusammengefasst (n=6). Mann-Whitney-U-Test * p<0.05, ** p<0.01, ns nicht signifikant, p>0,05.

Insgesamt verstärkte eine transiente Infektion mit *SmOVA* im Darm die Differenzierung von OT-I T-Zellen zu zytolytisch aktiven Effektorzellen, am stärksten

war der Effekt in IFABP \times ASBT-OVA Mäusen. Dabei zeigte eine Infektion mit OVA-exprimierenden Bakterien gegenüber dem *Sm*-Parentalstamm einen etwas stärker ausgeprägten Effekt.

3.9 Infektion mit *Salmonella* verstärkt eine immunvermittelte Cholangitis

Da eine lokale bakterielle Infektion mit *Sm* bzw. *SmOVA* im Darm die Aktivierung und Differenzierung von OT-I T-Zellen unabhängig vom Vorhandensein des Antigens im Bakterium verstärkte, wurde anhand (immun-) histologischer Färbungen und der ins Blut freigesetzten ALT-Menge untersucht, ob die Infektion mit Salmonellen einen Einfluss auf die Entstehung einer immunvermittelten Cholangitis in der Leber hat.

3.9.1 Histologie

In der histologischen Auswertung von Leberschnitten aus den einfach-transgenen Parentalstämmen IFABP-OVA und ASBT-OVA war histologisch nur ein geringer Anstieg der Zahl lobulär auftretender Infiltrate im Vergleich zu nicht infizierten Mäusen feststellbar, und es kam nicht zu periduktulären Infiltraten (Abb. 15A, B). Demgegenüber zeigten sich in IFABP \times ASBT-OVA Mäusen nach vorangegangener Infektion mit *Sm* oder *SmOVA* neben vereinzelt lobulären Infiltraten und diffus im Parenchym verteilten mononukleären Zellen eine Zunahme in Zahl und Umfang der periduktulären Infiltrate, welche immunhistochemisch als CD3⁺ T-Zellen charakterisiert werden konnten (Abb. 15C). Eine semi-quantitative histopathologische Auswertung bestätigte signifikante Veränderungen nach der Infektion (Abb. 16E).

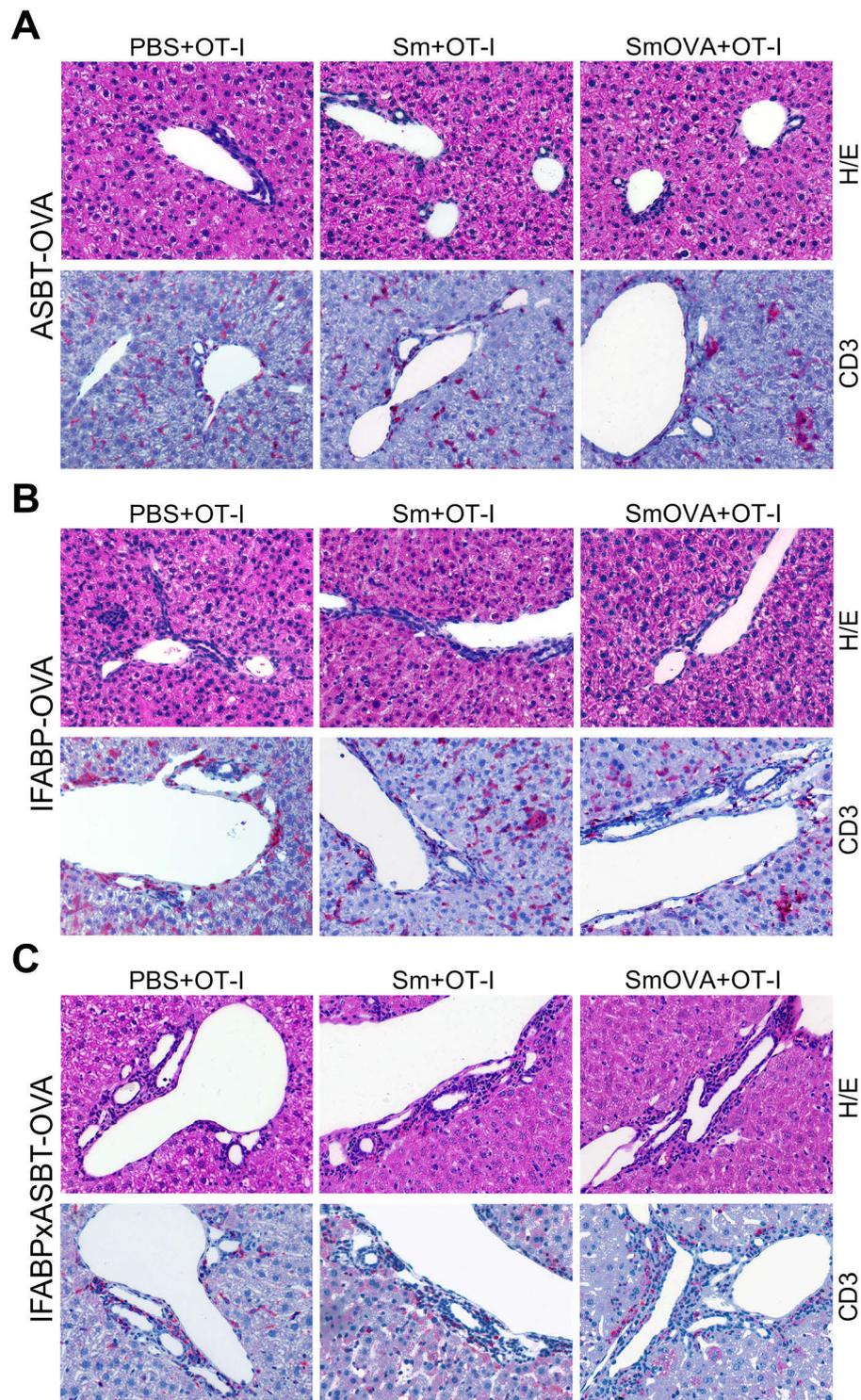


Abb. 15: Histologie nach *Salmonella*- bzw. *Salmonella*-OVA-Infektion

ASBT-OVA, IFABP-OVA und IFABPxASBT-OVA Mäuse wurden mit *Salmonella* (*Sm*) oder *Salmonella*-OVA (*SmOVA*) oral infiziert und zwei Tage später naive OT-I T-Zellen *i.v.* transferiert. Am Tag 7 nach dem T-Zell-Transfer wurden die Mäuse getötet und Schnitte von Leberproben aus (A) ASBT-OVA, (B) IFABP-OVA und (C) IFABPxASBT-OVA Mäusen für H/E und immunhistochemisch für CD3 (rot) gefärbt. Repräsentative Bilder aus zwei Experimenten (n = 6); Vergrößerung 200x.

3.9.2 Plasma-ALT

Um den zeitlichen Verlauf der Leberschädigung zu erfassen, wurde den Mäusen in regelmäßigen Abständen nach Infektion und adoptiven OT-I T-Zell-Transfer Blut entnommen und die Plasma-ALT Konzentration bestimmt. Während in ASBT-OVA Mäusen eine vorangegangene Infektion mit *Sm* zu keiner Veränderung des ALT-Wertes führte, kam es in IFABP-OVA Mäusen zu einer leichten, jedoch signifikanten Erhöhung am Tag 7 (<3x). In IFABP×ASBT-OVA Mäusen zeigte sich nach der *Sm*-Infektion eine Verdopplung des ALT-Wertes gegenüber der nicht infizierten Kontrollgruppe mit Höhepunkt am Tag 7, der bis zum Tag 14 langsam wieder nahezu das Ausgangsniveau abfiel (Abb. 16A). Ähnlich kam es nach Infektion mit *SmOVA* nur in doppelt-transgenen IFABP×ASBT-OVA Mäusen, jedoch nicht in den einfach-transgenen Parentalstämmen ASBT-OVA und IFABP-OVA, zu einer signifikanten Erhöhung des Plasma-ALT-Wertes. Trotz des starken ALT-Anstiegs (20x) blieb diese Hepatitis selbstlimitiert und klang bis zum Tag 14 nach OT-I T-Zell-Transfer nahezu vollständig ab (Abb. 16B). Zur übersichtlichen statistischen Analyse sind die Plasma-ALT-Werte von Tag 7 zusätzlich in Box-Plot-Diagrammen dargestellt (Abb. 16C). Während eine vorangegangene Infektion mit *Sm* oder *SmOVA* keine bzw. sehr geringe Auswirkungen auf den Plasma-ALT-Wert in den einfach-transgenen Parentalstämmen IFABP-OVA und ASBT-OVA hatte, zeigte sich in IFABP×ASBT-OVA Mäusen nach Infektion eine deutliche Verstärkung der Entzündung in der Leber (Abb. 16D).

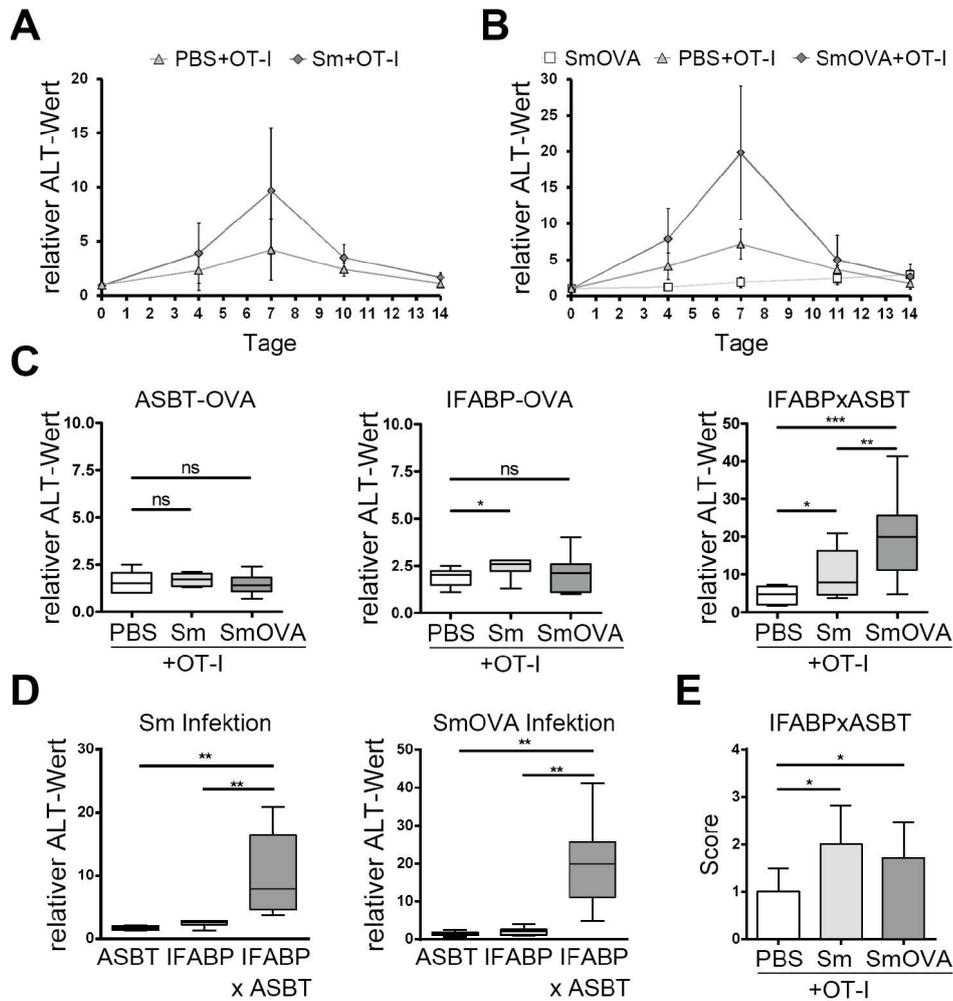


Abb. 16: ALT Werte in ASBT, IFABP, IFABP x ASBT nach *Salmonella*-Infektion

ASBT-OVA, IFABP-OVA und IFABP x ASBT-OVA Mäuse wurden mit *Salmonella* (*Sm*) oder *Salmonella*-OVA (*SmOVA*) oral infiziert und zwei Tage später wurden naive OT-I T-Zellen *i.v.* transferiert (Tag 0). (A) Verlauf der Plasma-ALT Konzentration bezogen auf den Ausgangswert nach *Sm*-Infektion in IFABP x ASBT-OVA Mäusen (n=8). (B) Verlauf der Plasma-ALT Konzentration bezogen auf den Ausgangswert nach *SmOVA*-Infektion in IFABP x ASBT-OVA Mäusen (n=8). (C), (D) Plasma-ALT Konzentration bezogen auf den Ausgangswert am Tag 7 nach OT-I T-Zelltransfer und *Sm* bzw. *SmOVA* Infektion in ASBT-OVA, IFABP-OVA und IFABP x ASBT-OVA Mäusen, in (D) Gegenüberstellung der Mausstämme am Tag 7. Die Ergebnisse wurden aus mindestens zwei Experimenten zusammengefasst. (E) Semi-quantitative Analyse der Histopathologie. Kruskal-Wallis-Test (Dunn's post-hoc Test)* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; n.s. nicht signifikant (p>0,05).

Zusammenfassend führte der mit einer lokalen *Sm*-Infektion einhergehende inflammatorische Kontext im GALT zu einer verstärkten Aktivierung von OT-I T-Zellen und zur Differenzierung zu zytotoxischen Effektorzellen. Wenn gleichzeitig endogenes Antigen in Darm und Leber in IFABP x ASBT-OVA Mäusen vorhanden war, kam es zu einer deutlich verstärkten immunvermittelten Cholangitis. Darüber hinaus wurde durch bakterielles Antigen von *SmOVA* eine Antigen-spezifische Kreuzreaktion

von OT-I T-Zellen gegen das gleiche endogene Antigen induziert und so eine immunvermittelte Cholangitis in IFABP \times ASBT-OVA Mäusen nochmals deutlich verstärkt.

3.9.3 Dendritische Zellen

Salmonella kann die Antigenpräsentation infizierter APC durch Interferenz mit dem MHC-II Präsentationsweg negativ beeinflussen (Qimron *et al.*, 2004), und obwohl Salmonellen nur in weniger als 1% der DC-Population vorkommen (Sundquist und Wick, 2005), die Reifung des überwiegenden Anteils nicht infizierter DC durch Typ-I Interferone *in trans* induzieren (Tam *et al.*, 2008). Da so auch endogene Antigene in einem co-stimulatorischen Kontext präsentiert werden können, sollte untersucht werden, welche Auswirkungen eine vorausgehende *Sm*-Infektion auf die Aktivierung und DC-Reifung als wichtigen Regulator der adaptiven Immunität hat. Am Tag 4 nach der *Sm*-Infektion zeigten CD11c^{high} DC in den mLN und in der Leber von IFABP \times ASBT-OVA Mäusen eine signifikant niedrigere Expression von MHC-II, während das co-stimulatorische Molekül CD86 insbesondere auf DC aus der Leber stärker exprimiert wurde (Abb. 17A). Diese Effekte auf die MHC-II und CD86 Expression waren auf CD8⁺ CD11c^{high} DC, welche für die Kreuzpräsentation eine besondere Rolle spielen (Shortman und Heath, 2010), noch deutlicher ausgeprägt (Abb. 17B). Interessanterweise betrifft dies nicht nur einen geringen Anteil der DC, welche von einer Infektion betroffen sein könnten, sondern die Mehrheit der Population. Sowohl in den mLN als auch in der Leber nahm der Anteil CD11c^{high} DC in Bezug auf die Gesamtymphozyten signifikant auf das Doppelte zu (Abb. 17C). Dabei blieben die relativen Anteile CD8⁺ CD11c^{high} DC in den mLN konstant bei ca. 25%, während in der Leber der Anteil signifikant zunahm (Abb. 17D). In den mLN exprimierten die immigrierenden DC also im gleichen Verhältnis CD8 wie ohne *Sm*-Infektion, während in der Leber nach der Infektion ca. doppelt so viele CD8⁺ CD11c^{high} DC vorkamen.

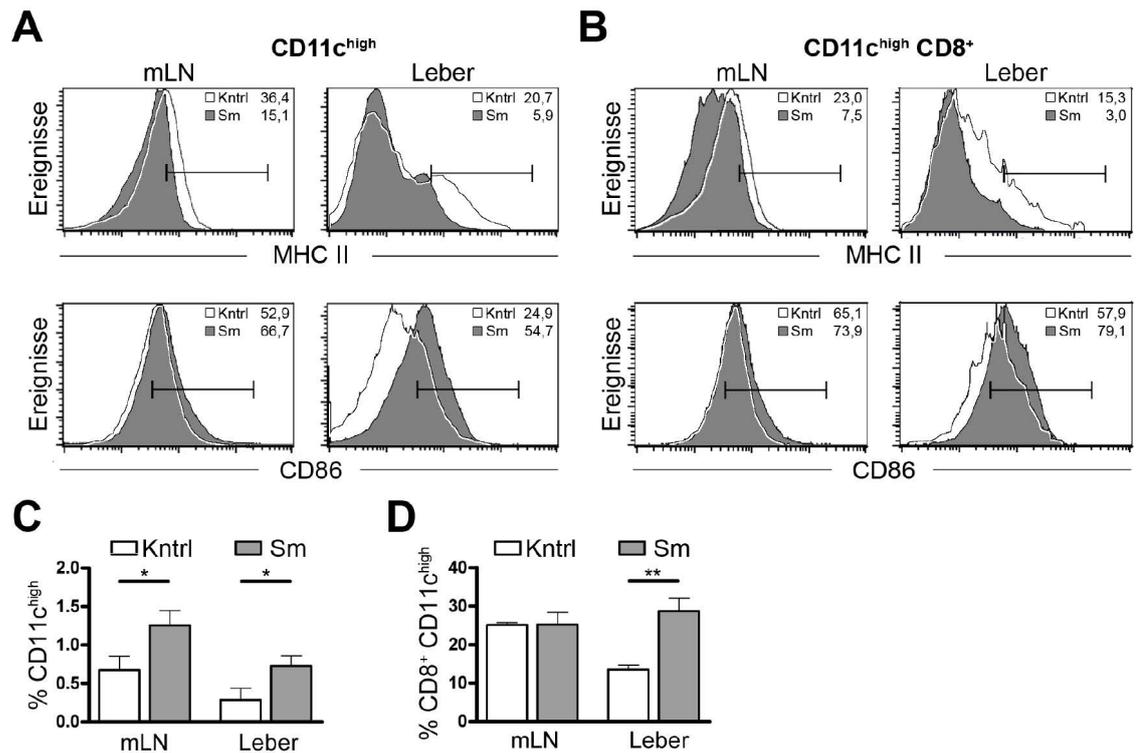


Abb. 17: Phänotyp und Verteilung Dendritischer Zellen nach *Salmonella*-Infektion

IFABP \times ASBT-OVA Mäuse wurden mit *Salmonella* (Sm) oral infiziert oder PSB verabreicht (Kntrl) und 2 Tage später naive OT-I T-Zellen *i.v.* transferiert. Am Tag 4 wurde die Expression von MHC-II und CD86 auf (A) CD11c^{high} oder (B) auf CD11c^{high} CD8⁺ durchflusszytometrisch gemessen, repräsentative Histogramme aus zwei Experimenten (n=6). (C) Der Anteil CD11c^{high} Zellen bezogen auf die Gesamtlmphozyten (FSC/SSC), bzw. (D) der Anteil CD8⁺ Zellen bezogen auf CD11c^{high} Lymphozyten sind als Mittelwert + Standardabweichung aufgetragen (n=6), Mann-Whitney-U-Test: * p<0,05, ** p<0,01.

Zusammenfassend führte der mit einer lokalen *Sm*-Infektion einhergehende inflammatorische Kontext in den mLN und darüber hinaus in der Leber zu einer erhöhten Anzahl und zu einer verstärkten Aktivierung und Reifung von DC, insbesondere bei CD8⁺ DC.

4. Diskussion

4.1 Aktivierung von T-Zellen im Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe

4.1.1 Aktivierung von T-Zellen im Kolon

Um die Rolle der enterohepatischen Migration von T-Zellen für die Induktion einer immunvermittelten Cholangitis zu untersuchen, bedurfte es eines Tiermodells, das es ermöglicht, T-Zellen lokal im GALT zu aktivieren und die immunologischen Effekte in der Leber zu verfolgen. Dazu wurde ein neuartiges Antigen-abhängiges Kolitis-Modell entwickelt, bei dem adoptiv transferierte CD8 T-Zellen durch in das Kolon appliziertes Antigen aktiviert werden, zu IFN- γ positiven, zytotoxischen Effektorzellen differenzieren und eine transiente lokale Entzündung auslösen.

Für die Untersuchung der enterohepatischen Migration waren von den vielen bekannten Kolitis-Modellen insbesondere CD8 T-Zell-abhängige Kolitis-Modelle relevant, da die initialen Infiltrate in der Leber von PSC-Patienten überwiegend aus aktivierten CD8 T-Zellen bestehen (Cruickshank *et al.*, 1999; Ponsioen *et al.*, 1999) und ebenso in Tiermodellen CD8 T-Zellen für die Entstehung einer Cholangitis eine dominante Rolle spielen (Hsu *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2008). Beispielsweise kann durch den Transfer von *Heat shock protein* (Hsp)-60 spezifischen CD8 T-Zellen in TCR- β defiziente Mäuse eine fatale Entzündung in Dünndarm und Kolon ausgelöst werden, die abhängig von TNF- α und der Kreuzpräsentation des endogenen Antigens auf MHC-I ist (Steinhoff *et al.*, 1999). In dieser Studie führt die Kreuzreaktivität zwischen bakteriellem und endogenem Hsp60 zur Antigen-spezifischen Aktivierung der CD8 T-Zellen im GALT, und interessanterweise migrieren diese aktivierten T-Zellen in die Leber, wo sie eine mäßiggradige Hepatitis auslösen. Wie die meisten Kolitis-Modelle setzt dies jedoch einen Defekt bei der Immunregulation voraus, was die Interpretation der Ergebnisse einschränkt. So ist in TCR- β defizienten Mäusen die thymische T-Zell-Reifung stark beeinträchtigt, so dass wie in *Recombination-Activating Gene* (RAG) 1/2-*Knockout*-Mäusen (Shinkai *et al.*, 1992) keine regulatorischen T-Zellen vorhanden sind und durch die ausgeprägte Lymphopenie adoptiv transferierte CD4 oder CD8 T-Zellen spontan proliferieren können und leicht

Entzündungen des Darms auftreten (Powrie *et al.*, 1994; Tajima *et al.*, 2008). Um die klinische Situation besser abzubilden, wurde daher ein Modell in immunkompetenten Mäusen entwickelt.

Bei der in der vorliegenden Arbeit entwickelten OVA-Kolitis werden adoptiv transferierte CD8 T-Zellen durch rektal appliziertes Antigen aktiviert und lösen in Wildtyp-Mäusen eine transiente Kolitis aus. Für die Induktion einer T-Zell-Reaktion, ist es notwendig, dass die Antigene von APC aufgenommen, prozessiert und auf MHC-I präsentiert werden (Neefjes *et al.*, 2011). Dazu wurde die Darmschleimhaut durch die rektale Gabe von Ethanol gestört, so dass die rektal applizierten Antigene in direkten Kontakt mit dem Epithelium treten konnten. Die luminalen löslichen Antigene können dann über Epithelzellen oder intraepitheliale Makrophagen aufgenommen und über Exosomen oder in direktem Zellkontakt durch *Gap-Junctions* an DC weitergeleitet werden (Mazzini *et al.*, 2014). Die erfolgreiche Präsentation des Antigens auf APC wurde in der vorliegenden Arbeit indirekt durch die Proliferation adoptiv transferierter, CFSE-markierter OT-I CD8 T-Zellen nachgewiesen. Dabei wurden proliferierende OT-I T-Zellen nicht nur in den mLN, sondern auch in Milz und Leber gefunden, was auf eine rasche Umverteilung der T-Zellen oder eine extraintestinale Aktivierung beispielsweise in der Milz hindeutet. Aufgrund der beträchtlichen Ethanol-induzierten Epithelbarriere-Störung ist eine Translokation des Antigens ins Blut und somit einen Transport in Leber und Milz nicht vollständig auszuschließen. Allerdings weist der Phänotyp der OT-I T-Zellen mit dem Darm-typischen Integrin $\alpha 4\beta 7$ auf eine überwiegende Aktivierung im GALT mit anschließender Rezirkulation hin, da dieser Phänotyp Retinolsäure-abhängig insbesondere von DC des Darms eingepreßt werden kann (Eksteen *et al.*, 2009). So kamen am Tag 2 nach dem Transfer in den mLN OVA-behandelter Mäuse fast doppelt so viele OT-I T-Zellen wie in den BSA-behandelten Kontrolltieren vor, wovon ca. 39% das Integrin $\alpha 4\beta 7$ exprimierten, während in Milz und Leber in beiden Gruppen der Anteil der OT-I T-Zellen an den Gesamtlymphozyten niedrig lag, und weniger als 19% der davon $\alpha 4\beta 7$ exprimierten (Abb. 21, siehe Anhang 6.1). Darüber hinaus weist der im Verlauf von Tag 2 bis Tag 5 sinkende Anteil Integrin $\alpha 4\beta 7$ positiver OT-I T-Zellen in den mLN darauf hin, dass das Antigen nur transient zur Aktivierung der naiven T-Zellen zur Verfügung stand.

Da das Antigen nur einmalig intrarektal appliziert wurde, wird es rasch aus dem Lumen verdrängt und degradiert, so dass eine Rezirkulation der im GALT aktivierten OT-I T-Zellen ohne ein stabil im Darm präsentiertes Antigen wahrscheinlich erscheint. Auch in der Literatur wird eine präferentielle, jedoch nicht ausschließlich durch das nominale Antigen und den Ort der Aktivierung bestimmte Migration im GALT aktivierter CD8 T-Zellen beschrieben, die zu einer raschen Rezirkulation von Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen auch durch nicht-lymphoide periphere Gewebe führt (Masopust *et al.*, 2004). Des Weiteren zeigte sich in Pilotexperimenten zur möglichen Blockierung der Effektor-T-Zell-Migration mittels eines gegen die Integrin-Untereinheit $\alpha 4$ gerichteten Antikörpers (Andrew *et al.*, 1994; Lobb und Hemler, 1994) bei der OVA-Kolitis *in vivo* eine drastische Reduktion von CD3⁺ T-Zellen im Kolon sowie signifikant niedrigere endoskopische und histologische Entzündungszeichen (Abb. 22, siehe Anhang 6.1), was auf einen direkten Zusammenhang der Kolitis mit einer Integrin $\alpha 4$ -abhängigen Migration im GALT aktivierter CD8 OT-I T-Zellen in das Kolon hinweist.

Die adoptiv transferierten OT-I T-Zellen proliferieren in OVA-behandelten Mäusen nicht nur, sondern differenzieren zu IFN- γ produzierenden, zytolytisch aktiven Effektorzellen. Dazu müssen die OT-I T-Zellen durch reife professionelle APC aktiviert worden sein, welche auch die für eine vollständige T-Zell-Differenzierung notwendigen Signale 2 (Co-Stimulation) und 3 (Zytokine) vermitteln. Die dazu nötige Reifung der DC kann direkt durch PAMP/DAMP-Kontakt oder *in trans* durch TNF- α und Typ-I Interferone ausgelöst werden (Joffre *et al.*, 2009). Dabei ist davon auszugehen, dass die Ethanol-induzierte Epithelbarriere-Störung ein Eindringen der bakteriellen Flora in sub-epitheliale Bereiche verursacht und so über PRR-Signale lokal ein pro-inflammatorische Kontext erzeugt wird, der die Reifung der APC und die Antigen-spezifische Differenzierung der transferierten CD8 OT-I T-Zellen zu Effektorzellen ermöglicht.

Neben dem primären Ziel der lokalen Antigen-spezifischen Aktivierung der CD8 OT-I T-Zellen, führt die rektale Applikation von OVA zu einer transienten Entzündung des Kolons. Die Folge war ein leichter bis mäßiger Gewichtsverlust, der in einem Zeitraum von fünf Tagen bei den meisten Tieren wieder vollständig zurückging. Dabei

liegt die recht große Varianz des Gewichtsverlusts zwischen verschiedenen Tieren wahrscheinlich in der individuellen effektiven Menge und Verweildauer der applizierten Ethanol- bzw. Antigenlösung im Kolon begründet, die auch durch eine forcierte Defäkation der Tiere vor dem Einlauf und der Erhöhung der Viskosität der Antigenlösung mittels Carboxymethylzellulose nur begrenzt standardisierbar war. Daher wurde der bei *in vivo* Experimenten nicht vermeidbaren Werte-Spreizung relativ unspezifischer Parameter wie dem Gewicht Rechnung getragen, indem weitere spezifischere Entzündungsparameter mittels Endoskopie und (Immun-) Histologie untersucht wurden. So wiesen OVA-behandelte Tiere mit einem transient stärkeren Gewichtsverlust auch bei bereits ansteigendem Gewicht am Tag 4 endoskopisch stärkere Entzündungszeichen im Kolon auf, als weniger betroffene oder BSA-behandelte Tiere. Der Endoskopie-Score korreliert also mit dem transienten Gewichtsverlust. In den histologischen Untersuchungen zeigten sich neben CD8 positiven T-Zellen Infiltrate mononukleärer Zellen, die zum Teil myeloide Peroxidase exprimieren, was auf Makrophagen und Neutrophile hindeutet. Diese aus dem Blut rekrutierten Zellen des angeborenen Immunsystems besitzen potente anti-mikrobielle Aktivitäten zur Begrenzung einer bakteriellen Translokation und können zur intestinalen Entzündung beitragen (Naito *et al.*, 2007). Der sowohl in der OVA- als auch in der BSA-behandelten Kontrollgruppe beobachtete akute Gewichtsverlust am Tag 1 nach der Behandlung ist wahrscheinlich eine direkte Folge der Ethanol-induzierten Epithelbarriere-Störung, da allein die repetitive intrarektale Applikation von 50% Ethanol eine histologisch ähnliche Kolitis hervorrufen kann (Andrade *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit war jedoch die lokale Antigen-spezifische Aktivierung von CD8 T-Zellen das primäre Ziel, daher wurde eine niedrigere Ethanolkonzentration von 30% genutzt, um einen proinflammatorischen Kontext für das rektal applizierte Antigen zu schaffen, aber die Tiere nicht zu stark zu beeinträchtigen. Durch die zusätzliche Applikation von OVA als definiertes Antigen wurde eine spezifische Differenzierung der transferierten CD8 OT-I T-Zellen zu zytotoxischen Effektorzellen erreicht, welche die Entzündungsreaktion der Ethanol-induzierten Epithelbarriere-Störung verstärkten und die verzögerte Erholung der OVA-behandelten Tiere bewirkten.

Eine Kolitis kann in immunkompetenten Mäusen auch chemisch durch die rektale Applikation des Haptens 2,4-Dinitrobenzensulfonsäure (DNBS) ausgelöst werden, welches Selbstproteine und Bestandteile der mikrobiellen Flora kovalent modifiziert und so CD4 und CD8 T-Zell-Antworten induziert, die bei der wiederholten rektalen Applikation von DNBS zu einer Entzündung führen. Wie bei der OVA-Kolitis differenzieren in diesem Modell CD8 T-Zellen zu Effektorzellen und sind für die Entstehung der Kolitis von entscheidender Bedeutung (Nancey *et al.*, 2006). Es treten dabei jedoch keine Infiltrate in der Leber auf, und das Hapten generiert kein definiertes Antigen im Darm, wodurch die enterohepatische Migration für die Entstehung einer Entzündung in der Leber nicht gezielt untersucht werden kann. Dies wird erst durch die Kombination des Antigen-spezifischen OVA-Kolitis Modells mit ASBT-Mäusen ermöglicht, die das gleiche Antigen transgen in den Cholangiozyten exprimieren. Die im GALT aktivierten CD8 T-Zellen migrierten hier in die Leber, wo sie durch das Vorhandensein des gleichen Antigens in den Cholangiozyten eine Cholangitis induzierten.

4.1.2 Aktivierung von T-Zellen im Dünndarm

Zusätzlich zum OVA-Kolitis Modell wurde mit IFABP-OVA Mäusen ein transgenes Mausmodell herangezogen, bei dem das Antigen in den Dünndarm-enterozyten exprimiert wird und adoptiv transferierte OT-I CD8 T-Zellen ebenfalls im GALT aktiviert werden. Die in IFABP-OVA Mäusen im GALT (mLN/Peyersche Plaques) aktivierten CD8 T-Zellen migrierten insbesondere in die Lamina propria und das intraepitheliale Kompartiment des Dünndarms, aber auch in andere lymphoide Organe, wie Milz, periphere Lymphknoten und Leber. Dies bestätigt die Ergebnisse einer früheren Studie, in der OT-I T-Zellen außerdem in Thymus, Knochenmark und in nicht lymphoiden Organen wie Gehirn, Niere, Fettgewebe, Lunge und Leber nachgewiesen wurden, wobei übereinstimmend ein großer Teil in der Leber vorkam (Masopust *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die transferierten OT-I CD8 T-Zellen zu IFN- γ produzierenden, zytotoxischen Effektorzellen differenzieren und die in die Lamina propria migrieren, jedoch keine Enteritis verursachen. Dafür ist eine (Kreuz-) Präsentation des transgenen epithelialen Antigens auf MHC-I notwendig, was durch professionelle APC, die apoptotische Enterozyten

endozytisch aufnehmen und zum mLN transportieren (Huang *et al.*, 2000), oder die Enterozyten selbst als nicht professionelle APC geschehen kann (Allez *et al.*, 2002). Ohne Entzündungsmediatoren durch PRR-Signale werden jedoch keine Effektor-Reaktionen induziert, sondern über PD-1/PD-L1 die Toleranz gegenüber dem endogenen Antigen aufrechterhalten (Reynoso *et al.*, 2009). Trotz der massiven T-Zell-Infiltration der Lamina propria kam es so auch in den Studien von Vezys *et al.* ohne einen zusätzlichen inflammatorischen Stimulus in Form einer Virusinfektion, durch Choleratoxin oder durch anti-CD40 nicht zu einer Enteritis, und nach 17 Tagen waren die transferierten OT-I T-Zellen vollständig deletiert (Vezys und Lefrancois, 2002; Vezys *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu der bei Vezys *et al.* für intraepitheliale Lymphozyten gezeigten geringen Effektorfunktion am Tag 5, konnte in der vorliegenden Arbeit eine vollständige Differenzierung zu IFN- γ produzierenden Effektor-T-Zellen nachgewiesen werden. Dies könnte durch die höhere Zahl transferierter OT-I T-Zellen (10x) begründet sein, wodurch eine Differenzierung ohne CD4 T-Zell-Hilfe ermöglicht und periphere Toleranzmechanismen überwunden werden können (Mintern *et al.*, 2002; Umeshappa *et al.*, 2013). Die physiologisch vorhandene Zahl regulatorischer T-Zellen kann dabei die Aktivierung der großen Zahl monoklonaler CD8 T-Zellen nicht vollständig unterdrücken, das Gleichgewicht wird durch die gleichzeitige Induktion regulatorischer T-Zellen durch einen positiven IL-2 *Feedback*-Mechanismus jedoch rasch wiederhergestellt (McNally *et al.*, 2011). Daher kommt es trotz der dauerhaften transgenen Expression des Antigens im Dünndarmepithel wie bei der OVA-Kolitis nur zu einer transienten Effektorphase, die keine chronische Pathologie hervorruft.

In einem alternativen transgenen Mausmodell, in dem unter dem Villin-Promotor ein Modellantigen in Enterozyten exprimiert wird, wurde jedoch eine vollständige Differentiation zu Effektorzellen und die Induktion einer Enteritis ohne einen zusätzlichen inflammatorischen Stimulus beschrieben (Westendorf *et al.*, 2006). Das Antigen wird in diesem Modell in den Villi- und Kryptenepithelzellen exprimiert, während in IFABP-OVA Mäusen das Antigen nur in reifen Epithelzellen und nicht in den Krypten vorkommt (Vezys *et al.*, 2000), welche als Stammzellnische eine wichtige Rolle in der Epithelhomöostase spielen. Etwaige Störungen des Kryptenepithels haben demnach

für die intestinale Barriere größere Auswirkungen, als die Zerstörung reifer Epithelzellen, die konstant durch neue Zellen ersetzt werden (Peterson und Artis, 2014). Interessanterweise führte eine direkte Kreuzung der Villin-transgenen Mäuse mit TCR-transgenen Mäusen zu peripherer Toleranz, ebenso der Co-Transfer von Antigen-spezifischen regulatorischen T-Zellen (Westendorf *et al.*, 2006). Für das primäre Ziel der Antigen-spezifischen Aktivierung von CD8 T-Zellen im GALT, um die Entstehung einer immunvermittelten Cholangitis zu untersuchen, ist das IFABP-OVA Modell ohne die Ausprägung einer starken Enteritis besser geeignet und wurde daher in der vorliegenden Arbeit verwendet.

4.1.3 Phänotyp von im GALT aktivierten T-Zellen

Trotz ähnlich ausgeprägter Effektorfunktionen, wie IFN- γ Produktion und Zytotoxizität, unterscheiden sich die in IFABP-OVA Mäusen oder in Wildtyp-Mäusen mit OVA-Kolitis im GALT aktivierten OT-I T-Zellen deutlich hinsichtlich der Chemokinrezeptor- und Integrin-Expression (Tabelle 4, siehe Anhang 6.1). So zeigten OT-I T-Zellen aus IFABP-OVA Mäusen gegenüber Wildtyp-Mäusen mit OVA-Kolitis einen signifikant höheren Anteil $\alpha 4\beta 7^+$ und CCR9⁺ Zellen, während der Anteil der Integrin-Untereinheit $\beta 1^+$ Zellen geringer ausfiel und CXCR3 und CCR5 in beiden Modellen ähnlich stark exprimiert wurde. Gleichzeitig wiesen in IFABP-OVA Mäusen mehr OT-I T-Zellen einen vollständig aktivierten CD62L⁻/CD44^{high} Phänotyp auf.

Die Unterschiede zwischen den Modellen könnten zum Teil in der oben angedeuteten unterschiedlichen Menge des Antigens und der Dauer der Antigenpräsentation begründet sein. Während im OVA-Kolitis Modell das Antigen nur transient im Kolon vorhanden ist und nur kurzfristig zur Präsentation im GALT zur Verfügung steht, ermöglicht die kontinuierliche transgene Expression des Antigens in Enterozyten einen wiederholten Kontakt der transferierten OT-I T-Zellen mit professionellen APC, so dass mehr Zellen vollständig aktiviert werden (CD62L⁻/CD44^{high}) und bei einem größeren Anteil der Darm-*Homing* Phänotyp $\alpha 4\beta 7^+$ /CCR9⁺ eingepägt werden kann. Dabei ist zu beachten, dass der Chemokinrezeptor CCR9 insbesondere für die Migration in den Dünndarm eine wichtige Rolle spielt und für das Kolon nur von untergeordneter Bedeutung ist (Kwon *et al.*, 2002; Teramoto *et al.*, 2005).

Entsprechend könnte sich die erhöhte Expression in IFABP-OVA Mäusen im Vergleich zum OVA-Kolitis Modell erklären.

Mit der erhöhten Expression des Integrins $\alpha 4\beta 7$ geht auf OT-I T-Zellen in IFABP-OVA Mäusen eine erniedrigte Expression der $\beta 1$ -Integrinkette einher, da $\beta 1$ und $\beta 7$ um die Bindung der gemeinsamen Untereinheit $\alpha 4$ konkurrieren und über miteinander verknüpfte Signalwege reguliert werden (Andrew *et al.*, 1994). Gleichzeitig weist der hohe Anteil CXCR3⁺ OT-I T-Zellen und die vergleichbar niedrige CCR5 Expression auf ein ähnliches co-stimulatorisches Zytokinmilieu mit viel IFN- γ (Nakajima *et al.*, 2002) und wenig IL-12 (Iwasaki *et al.*, 2001) hin, da die Expression der Chemokinrezeptoren auf aktivierten T-Zellen direkt von der Co-Stimulation mit diesen Zytokinen abgänglich ist. Auch für die hier beobachtete CD8 T-Zell-Aktivierung ohne CD4 Hilfe ist ein Interferon-reiches Zytokinmilieu notwendig, welches insbesondere durch PRR-Signale induziert werden kann (Wiesel und Oxenius, 2012). Bei der OVA-Kolitis werden diese wegen der Ethanol-induzierten Epithelbarriere-Störung wahrscheinlich von der eindringenden intestinalen Flora hervorgerufen, bei IFABP-OVA Mäusen ist die Ursache unklar. Möglicherweise spielt eine parakrine Zytokin-Stimulation durch die hohe Zahl der transferierten naiven CD8 OT-I T-Zellen dabei eine Rolle (Mintern *et al.*, 2002; Umeshappa *et al.*, 2013).

Darüber hinaus ist nicht auszuschließen, dass die untersuchten Migrationsmoleküle der im GALT aktivierten CD8 T-Zellen einer dynamischen Plastizität unterliegen, so dass der initial eingepägte Phänotyp bei erneutem Antigenkontakt nach der Migration in den Darm bzw. in der Leber lokal modifiziert werden könnte (Mora und von Andrian, 2006). So weisen beispielsweise OT-I T-Zellen in den intraepithelialen Lymphozyten sowohl im OVA-Kolitis Modell als auch in IFABP-OVA Mäusen einen deutlich gesteigerten Anteil CCR5⁺ Zellen gegenüber den anderen untersuchten Organen auf (Tabelle 4, siehe Anhang 6.1). Ob dies an einer Akkumulation dieser Zellen im Darm oder einer Anpassung der Expression aufgrund der lokalen Mikroumgebung begründet liegt, ist unklar.

Trotz der unterschiedlichen Menge des verfügbaren Antigens im OVA-Kolitis Modell und in IFABP-OVA Mäusen differenzieren die OT-I T-Zellen in beiden Modellen zu Effektorzellen, und es kommt zu einer ähnlichen starken Migration IFN- γ

produzierender Zellen in die Leber, wo sie bei Vorhandensein des gleichen Antigens eine immunvermittelte Cholangitis in den Cholangiozyten auslösen. Interessanterweise wurde jedoch nur in IFABP-OVA und IFABP \times ASBT-OVA Mäusen eine signifikante zytolytische Aktivität der OT-I T-Zellen in der Leber nachgewiesen. Da hier jedoch etwa gleich viele IFN- γ produzierende Zellen in der Leber vorhanden waren wie bei einer OVA-Kolitis, ist ein einfacher quantitativer Effekt auszuschließen. Die messbare zytolytische Aktivität könnte entweder durch eine differentielle Lokalisation der Effektorzellen innerhalb der Leber oder durch eine erhöhte Funktionalität der OT-I T-Zellen aufgrund der stabilen transgenen Antigenexpression im Darm zu erklären sein. Immunhistologisch waren in der Leber von IFABP-OVA und IFABP \times ASBT-OVA Mäusen zusätzlich zu periduktulären Infiltraten auch diffus im Parenchym verteilte CD3⁺ T-Zellen zu finden, welche kaum in der Leber von Tieren mit OVA-Kolitis auftraten. Dieser Befund spricht dafür, dass die OT-I Effektorzellen vor allem in IFABP-OVA und IFABP \times ASBT-OVA Mäusen in direkten Kontakt mit den markierten Zielzellen treten konnten, welche die Lebersinusoiden passieren. Eine erhöhte Funktionalität der OT-I T-Zellen in IFABP-OVA und IFABP \times ASBT-OVA Mäusen scheint demgegenüber unwahrscheinlich, da in Milz und mLN eine ähnliche zytolytische Aktivität wie in Mäusen mit OVA-Kolitis detektiert wurde. Insgesamt ist die Aktivierung der CD8 T-Zellen im GALT – unabhängig vom Ort des Antigens im Darm – hinreichend für die Induktion einer immunvermittelten Cholangitis. Sowohl bei einer OVA-Kolitis in ASBT-OVA Mäusen, als auch in IFABP \times ASBT-OVA Mäusen kommt es zu einer transienten Entzündung in der Leber mit einer ähnlichen Erhöhung der Plasma-ALT Konzentration. Dies steht im Gegensatz zur klinischen Situation, wo die PSC mit dem Auftreten einer Kolitis jedoch nicht mit einer Entzündung im Dünndarm assoziiert ist (Pollheimer *et al.*, 2011a). Der Unterschied könnte dadurch erklärt werden, dass bei Patienten die mutmaßlichen (Auto-) Antigene vor allem im Kolon vorkommen, wobei angesichts der Verteilung der intestinalen Flora im Gastrointestinaltrakt mit einer drastischen Zunahme der Bakteriendichte im terminalen Ileum und im Kolon bakterielle Antigene für die Aktivierung von T-Zellen bei CED wahrscheinlich sind (Neurath, 2014). Da die (Auto-) Antigene bislang jedoch noch unbekannt sind, wurde in der vorliegenden Arbeit das definierte Modellantigen OVA in transgenen Mäusen genutzt.

4.2 Aktivierung von T-Zellen in der Leber

Um die Rolle Antigen-spezifisch im GALT aktivierter T-Zellen für die Induktion einer immunvermittelten Cholangitis zu untersuchen, wurden ASBT-OVA Mäuse verwendet, welche das Antigen Ovalbumin in den Epithelzellen der Gallengänge exprimieren (Derkow *et al.*, 2007). Die früheren Ergebnisse der Arbeitsgruppe, wonach es in diesen Mäusen nach dem adoptiven Transfer von OT-I T-Zellen zu einer Antigen-spezifischen Aktivierung der T-Zellen in der Leber und dem Leberlymphknoten, jedoch nicht zu einer wesentlichen Pathologie in der Leber kommt (Derkow *et al.*, 2007), wurden in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Dabei ist im Gegensatz zu IFABP-OVA Mäusen oder Wildtyp-Mäusen mit OVA-Kolitis in ASBT-OVA Mäusen kaum eine Differenzierung der proliferierenden OT-I CD8 T-Zellen zu IFN- γ produzierenden zytotoxischen Effektorzellen zu beobachten. Die Kreuzpräsentation des endogenen Modellantigens führt hier zu peripherer Toleranz, welche durch die *in vivo* Aktivierung der CD8 T-Zellen im GALT, entweder durch transgene Expression im Dünndarm in IFABPxASBT-OVA Mäusen oder durch intrarektale Applikation in Rahmen einer OVA-Kolitis transient überwunden werden kann und dann zur Induktion einer immunvermittelten Cholangitis führt.

Dabei spielt wahrscheinlich auch die begrenzte Menge des potentiell präsentierbaren Antigens aus absterbenden Cholangiozyten gegenüber der deutlich größeren Zahl intestinaler Epithelzellen, welche einem schnellen Regenerationszyklus unterliegen, eine Rolle (Zelenay und Reis e Sousa, 2013). Darüber hinaus wird das Antigen in der Leber in einem besonders tolerogenen lokalen Mikromilieu präsentiert, während Effektor-Reaktionen vor allem im drainierenden Leberlymphknoten initiiert werden (Bowen *et al.*, 2004). Außerhalb eines inflammatorischen Kontexts wird jedoch Toleranz gegenüber dem endogenen Antigen vermittelt. Dementsprechend fanden sich in der Leber von ASBT-OVA Mäusen mit OVA-Kolitis signifikant weniger IFN- γ produzierende OT-I T-Zellen als in Wildtyp-B6 Mäusen mit OVA-Kolitis ($5,2 \pm 2,2\%$ vs. $9,5 \pm 3,6\%$ der CD8⁺ Zellen, U-Test $p < 0,05$). Auch in IFABPxASBT-OVA Mäusen produzierten gegenüber IFABP-OVA Mäusen in der Leber weniger der vorhandenen OT-I T-Zellen IFN- γ . Gleichzeitig kamen in IFABPxASBT-OVA Mäusen

mehr OT-I T-Zellen bezogen auf die Gesamtlymphozyten in der Leber als in IFABP-OVA Mäusen vor. Diese Zunahme an OT-I T-Zellen in der Leber von IFABP \times ASBT-OVA Mäusen bei entsprechend signifikant weniger OT-I T-Zellen in der Milz und den mLN, könnte durch eine Antigen-spezifische Retention der OT-I T-Zellen in der Leber aufgrund der transgenen OVA-Expression in den Cholangiozyten begründet sein. Dafür spricht auch die größere Anzahl proliferierender CFSE⁺ Zellen in der Leber von IFABP \times ASBT-OVA Mäusen gegenüber IFABP-OVA Mäusen am Tag 2 nach dem Transfer. Gleichzeitig könnte die Präsentation des endogenen Antigens durch hepatische APC im IL-10 reichen Mikromilieu der Leber dazu führen, dass die immigrierenden OT-I T-Zellen tolerogene Signale erhalten, welche sich in der erniedrigten Zytokinproduktion niederschlagen. So sind LSEC in der Lage, CD8 T-Zellen Antigen-spezifisch zu inhibieren und durch Anergie oder Apoptose Toleranz zu induzieren (Crispe, 2003; Schildberg *et al.*, 2008).

Der initial eingeprägte Phänotyp der im GALT aktivierten CD8 Effektorzellen könnte also einer dynamischen Plastizität unterliegen und war dennoch geeignet, eine immunvermittelte Cholangitis zu induzieren. Demgegenüber war der Transfer von *in vitro* aktivierten CD8 OT-I T-Zellen nicht hinreichend, um eine Cholangitis zu induzieren, was unterschiedliche Ursachen haben kann. So könnten einerseits die transferierten OT-I T-Zellen bei einem erneuten Antigenkontakt mit APC der Leber in ASBT-OVA Mäusen lokal so modifiziert werden, dass Toleranz gegenüber dem endogenen Antigen induziert wird. Andererseits könnte die differenzielle Expression der Integrine und Chemokinrezeptoren (Tabelle 3, siehe Anhang 6.1) zu einer entsprechend veränderten Migration der *in vitro* aktivierten OT-I T-Zellen geführt haben. So zeigte sich in ASBT-OVA Mäusen keine Anreicherung von *in vitro* aktivierten OT-I T-Zellen in der Leber, sondern eine Akkumulation in der Milz. Insbesondere die fehlende Expression des Integrins $\alpha 4\beta 7$ und die niedrigere Expression der Integrin-Untereinheit $\beta 1$ könnten dafür verantwortlich sein, da diese eine wichtige Rolle für die Migration extrahepatisch aktivierter CD8 T-Zellen in die Leber spielen (John und Crispe, 2004). Demnach ist ein Antigen-spezifisches *Priming in vivo* notwendig, um eine Migration von CD8 T-Zellen in die Leber zu ermöglichen. Im Gegensatz dazu wurde in anderen Studien jedoch nach dem adoptiven Transfer von *in vitro* aktivierten

CD8 OT-I T-Zellen eine präferentielle Migration in die Leber gefunden (Kuniyasu *et al.*, 2004; Kuniyasu *et al.*, 2005). Dabei wurden die Zellen *in vitro* über einen längeren Zeitraum von 72h mit dem hochaffinen Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ ohne zusätzliche Co-Stimulation mittels anti-CD28 inkubiert, so dass die Zellen durch *Activation Induced Cell Death* rasch apoptotisch wurden und sich wahrscheinlich deshalb in der Leber anreicherten (Huang *et al.*, 1994). Der Phänotyp der transferierten T-Zellen hinsichtlich der Integrin-Expression wurde in diesen Studien nicht näher charakterisiert, so dass der detaillierte Mechanismus offen bleibt.

Parallel zu den ASBT-OVA Mäusen unserer Arbeitsgruppe wurde unabhängig das OVA-Bil Modell entwickelt, bei dem ebenfalls eine Ovalbumin-Teilsequenz als Modellantigen in Cholangiozyten transgen exprimiert wird und durch den Co-Transfer von OVA-spezifischen CD4 ($4 \cdot 10^6$ OT-II) und CD8 ($10 \cdot 10^6$ OT-I) T-Zellen eine transiente Cholangitis induziert werden kann (Buxbaum *et al.*, 2006). Da jedoch übereinstimmend mit den hier gezeigten Ergebnissen in diesen Mäusen bei einem Transfer von $5 \cdot 10^6$ OT-I T-Zellen nur eine schwache T-Zell-Reaktion ausgelöst wird, ist davon auszugehen, dass die normalerweise induzierte periphere Toleranz aufgrund der unphysiologisch hohen Zahl transferierter CD8 T-Zellen und der zusätzlichen Antigen-spezifischen CD4 T-Zell-Hilfe transient durchbrochen wird (Mintern *et al.*, 2002; Umeshappa *et al.*, 2013). Wie in ASBT-OVA Mäusen entstehen dabei weder eine chronische Cholangitis noch fibrotische Veränderungen, und die Cholangitis ist nicht mit einer Kolitis assoziiert, wie es bei Patienten mit PSC der Fall ist. Mittels der Kombination von ASBT-OVA Mäusen mit Kolitis-Modellen wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass durch die enterohepatische Migration von im GALT aktivierten CD8 T-Zellen die Darmentzündung direkt mit der Induktion einer immunvermittelten Cholangitis verbunden ist. Dabei traten erhöhte ALT-Werte und periduktuläre Infiltrate nur dann auf, wenn das Antigen in den Cholangiozyten exprimiert wurde und nicht in Wildtyp-Mäusen, was eine unspezifische *Bystander*-Hepatitis ausschließt (Bowen *et al.*, 2002).

4.3 Enterohepatische Migration

Unabhängig von der Aufrechterhaltung der lokalen Immunbalance akkumulieren in der Leber insbesondere aktivierte CD8 T-Zellen, während naive CD4 und CD8 T-Zellen kaum retiniert werden (Mehal *et al.*, 1999). Dieser Vorgang wird insbesondere durch Interaktionen zwischen ICAM-1 und VCAM-1 auf dem Endothel sowie LFA-1 ($\alpha\text{L}\beta\text{2}$) und VLA-4 ($\alpha\text{4}\beta\text{1}$) auf T-Zellen vermittelt, die bei der Aktivierung heraufreguliert werden (John und Crispe, 2004). Dabei ist die Interaktion LFA-1/ICAM-1 vor allem für die Antigen-spezifische Rekrutierung in die Leber verantwortlich, indem die Präsentation des Antigens auf APC die Affinität der Adhäsionsmoleküle erhöht (Mehal *et al.*, 2001), während VLA-4/VCAM-1 vor allem für die unspezifische Rekrutierung extra-hepatisch aktivierter CD8 T-Zellen benötigt wird (John und Crispe, 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurden CD8 T-Zellen *in vivo* entweder durch die lokale Applikation des Antigens ins Kolon (OVA-Kolitis) oder die transgene Expression in Dünndarm-Enterozyten (IFABP-OVA) extra-hepatisch im GALT aktiviert, sodass die gemessene gesteigerte Expression der Integrine $\alpha\text{4}\beta\text{7}$ und $\alpha\text{4}\beta\text{1}$ (VLA-4) für die beobachtete Migration in die Leber eine wichtige Rolle spielen könnte. Das Integrin $\alpha\text{4}\beta\text{7}$ bindet nicht nur an das Darm-typische MAdCAM-1, sondern auch an VCAM-1. Dabei wird die spezifische Affinität von $\alpha\text{4}\beta\text{7}$ für die Zelladhäsionsmoleküle über die Chemokine CCL25 und CXCL10 bzw. die intrazellulären Signalkaskaden der zugehörigen Rezeptoren CCR9 und CXCR3 reguliert (Sun *et al.*, 2014). Eben diese Chemokinrezeptoren wurden in der vorliegenden Arbeit auf den im GALT-aktivierten CD8 T-Zellen detektiert, und in der Leber von Mäusen mit chronischer Kolitis wurde eine erhöhte Expression der Chemokine CCL25 und CXCL10 sowie VCAM-1 nachgewiesen. Zusammen mit anderen Chemokinen, wie CCL21 und CCL28, die ebenfalls die Bindung von $\alpha\text{4}\beta\text{7}$ und $\alpha\text{4}\beta\text{1}$ an VCAM-1 vermitteln, und die neben CCL25 und CXCL10 vermehrt in der Leber von PSC-Patienten exprimiert werden, könnte es so zu einer gesteigerten Retention von Lymphozyten in der Leber und zu Kreuzreaktionen gegen dukuläre Antigene kommen (Borchers *et al.*, 2009). Innerhalb der Leber wird die Migration der Lymphozyten zu den Gallengängen vor allem durch die Kombination

der Chemokine CXCL10, CXCL12, CXCL16 und CX3CL1 bzw. der Expression der korrespondierenden Chemokinrezeptoren auf den Lymphozyten bestimmt (Borchers *et al.*, 2009). Ob diese Chemokine auch im ASBT-OVA Mausmodell von Bedeutung sind, ist noch unklar. Aufgrund der auch in der Leber von Patienten mit PBC nachgewiesenen erhöhten Expression von CXCL10 (Chuang *et al.*, 2005) und der bekannten Verbindung von CXCL10 mit fibrotischen Veränderungen (Hintermann *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011), wäre die nähere Untersuchung der intrahepatischen Migration von großer Bedeutung für die Entwicklung eventueller Interventionsmöglichkeiten.

Die Rekrutierung von Lymphozyten und Neutrophilen zu den Gallengängen wird durch eine Vielzahl sezernierter pro-inflammatorischer Zytokine sowie durch Zelladhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und VCAM-1 aktiv von den Cholangiozyten beeinflusst (Fava *et al.*, 2005). Gleichzeitig können Cholangiozyten auch anti-inflammatorische Moleküle wie PD-L1/2, TGF- β und Prostaglandine wie PG-E2 exprimieren und stehen in einem komplexen Gleichgewicht mit Myofibroblasten, Kupffer-Zellen und APC. Bei einer genetischen Prädisposition kann eine Störung des Gleichgewichts zur *Ductular Reaction* führen, die als Schrittmacher chronischer Cholangitiden gilt (Penz-Osterreicher *et al.*, 2011). Dabei dienen die Zelladhäsionsmoleküle nicht nur der Steuerung der T-Zell-Migration, sondern fördern durch die Inhibition der Apoptose von $\alpha 4\beta 1$ positiven T-Zellen über VCAM-1 ausgelöste Signale direkt die Persistenz der Entzündung (Afford *et al.*, 2014).

In der vorliegenden Arbeit und durch andere Gruppen wurde gezeigt, dass bei einer chronischen Kolitis über die Portalvene vom Darm vermehrt pro-inflammatorische Zytokine, wie TNF- α , IFN- γ , IL-1 β und IL-6 in die Leber gelangen (Alex *et al.*, 2009; Dieleman *et al.*, 1998). Diese können konstitutiv kaum exprimierte Chemokine wie CXCL10 induzieren sowie auf portalen Endothelzellen und Sinusoiden die niedrige basale Expression von ICAM-1, VCAM-1 und des CD44 Liganden Hyaluronan stark ansteigen lassen (Lee und Kubes, 2008; McDonald *et al.*, 2008). In der Folge wiesen Mäuse mit chronischer DSS-Kolitis in der Leber eine verstärkte Rekrutierung von aktivierten endogenen CD4 und insbesondere CD8 T-Zellen auf. Diese exprimierten häufiger die Integrine $\alpha 4\beta 7$ und die Untereinheit $\beta 1$, was auf eine Aktivierung im GALT im Zuge der chronischen Kolitis hinweist. Aktivierte CD8

T-Zellen und T_h1 CD4 T-Zellen sind auch an der Entzündung im Darm von CED-Patienten maßgeblich beteiligt (Papadakis *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2007) und weisen eine starke Expression von CXCR3 auf (Groom und Luster, 2011). Bei einer Akkumulation dieser Effektorzellen können die sezernierten pro-inflammatorischen Zytokine eine positive *Feedback*-Schleife erzeugen, weshalb der CXCR3-Signalweg mit der Entstehung autoimmuner Erkrankungen in Verbindung gebracht wird (Lacotte *et al.*, 2009). Mit Hilfe der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Tiermodelle ist es gelungen, einen direkten Zusammenhang zwischen CED und der erhöhten Expression des Liganden CXCL10 in der Leber herzustellen, was eine Beteiligung des CXCR3-Signalwegs auch bei der PSC möglich erscheinen lässt.

Zusätzlich zur VCAM-1-vermittelten unspezifischen Retention extra-hepatisch aktivierter CD8 T-Zellen in der Leber ist aufgrund der transgenen Expression des Modellantigens Ovalbumin in den Cholangiozyten von ASBT-OVA Mäusen auch eine partielle Antigen-spezifische Rekrutierung der CD8 T-Zellen über ICAM-1 anzunehmen. So zeigten Derkow *et al.* in ASBT-OVA Mäusen eine präferentielle Migration naiver CD8 OT-I T-Zellen in die Leber (Derkow *et al.*, 2007), was in einer unabhängigen Studie mit einem anderen Modellantigen als ICAM-1 vermittelter Prozess spezifiziert wurde (Bertolino *et al.*, 2005). Trotz lokaler Aktivierung und Proliferation der adoptiv in ASBT-OVA Mäuse transferierten OT-I T-Zellen kam es dabei nicht zu einer signifikanten Erhöhung der ALT-Konzentration im Blut (Derkow *et al.*, 2007). In der vorliegenden Arbeit wurden diese Ergebnisse bestätigt und darüber hinaus gezeigt, dass adoptiv transferierte OT-I T-Zellen eine transiente Cholangitis in ASBT-OVA Mäusen auslösen können, wenn die Tiere gleichzeitig unter einer chronischen Kolitis leiden. Dabei führt die chronische Kolitis auch zu einer verstärkten Expression von ICAM-1 auf den LSEC, so dass neben den auf den OT-I T-Zellen näher untersuchten VCAM-1-bindenden α 4-Integrinen, auch die α L β 2 (LFA-1) vermittelte Bindung an ICAM-1 eine Rolle für die Migration in die Leber spielen könnte.

Interessanterweise wurde in einer früheren Studie bei akuter DSS-Kolitis, trotz erhöhter Expression von ICAM-1, VCAM-1 und MAdCAM-1 im Kolon, keine signifikante Veränderung in der Expression von ICAM-1 und VCAM-1 sowie keine aberrante Expression von MAdCAM-1 in der Leber beobachtet (Soriano *et al.*, 2000).

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene erhöhte Expression von ICAM-1 und VCAM-1 in der Leber wurde dagegen in Mäusen mit chronischer Kolitis gefunden, was auf unterschiedliche Bedingungen in der Leber während einer akuten oder chronischen Entzündung im Darm hinweist, die noch näher charakterisiert werden müssen.

Auch das Transmembranprotein CD44, welches bei Aktivierung des TCR auf T-Zellen heraufreguliert wird und in verschiedenen Isoformen und Glykosylierungen auftritt, trägt durch die Bindung an eine Vielzahl von extrazellulären Matrixbestandteilen, wie Hyaluronan und Kollagen sowie an E-/L-Selektin und Fibrin zur Migration, Differenzierung und zum Überleben von CD4 und CD8 T-Zellen bei (Baaten *et al.*, 2010). In der vorliegenden Arbeit wiesen die im GALT aktivierten OT-I CD8 T-Zellen erwartungsgemäß eine vermehrte Expression von CD44 auf, und es wurde gegenüber den untersuchten sekundären lymphatischen Organen ein erhöhter Anteil CD44 positiver OT-I Zellen in der Leber gefunden, was auf eine präferentielle Migration bzw. Retention hinweist. Dabei ist zu beachten, dass in der entzündeten Leber CD44-Liganden wie Hyaluronan in den Sinusoiden vermehrt exprimiert werden, was das Rekrutierungspotential für pro-inflammatorische Lymphozyten positiv verstärken kann (McDonald *et al.*, 2008; Mohamadzadeh *et al.*, 1998).

Der jeweilige Beitrag der zuvor genannten Integrine, von CD44 oder anderer Moleküle für die Migration der OT-I T-Zellen in die Leber kann aus den vorliegenden Daten nicht exakt bestimmt werden. Die beobachteten Verteilungen von im GALT aktivierten OT-I und endogenen T-Zellen oder von *in vitro* aktivierten OT-I T-Zellen deutet jedoch auf eine bedeutende Funktion der Integrine für eine Retention in der Leber hin. So zeigten im GALT aktivierte OT-I T-Zellen in der Leber gegenüber Milz und mLN eine Anreicherung von Integrin $\alpha 4\beta 7$ und $\beta 1$ positiven Zellen, was auf eine präferentielle Migration hinweist und mittels direkter *Homing Assays* in unserer Arbeitsgruppe bestätigt wurde (Eickmeier *et al.*, 2014). Außerdem wurde während einer chronischen Kolitis für endogene T-Zellen eine Anreicherung insbesondere aktivierter (CD44^{high}) CD8 T-Zellen in der Leber beobachtet, welche entsprechend einer primären Aktivierung im GALT einen erhöhten Anteil von $\alpha 4\beta 7$ und $\beta 1$ exprimierten. Auf der anderen Seite wiesen *in vitro* aktivierte OT-I T-Zellen mit fehlender $\alpha 4\beta 7$ -Expression und niedriger Expression der Integrin-Untereinheit $\beta 1$ in ASBT-OVA

Mäusen keine präferentielle Migration in die Leber auf, sondern akkumulierten in der Milz. Zusätzlich konnte in Pilotexperimenten durch die Gabe eines blockierenden anti-Integrin $\alpha 4$ Antikörpers im OVA-Kolitis Modell nicht nur die Migration von OT-I T-Zellen in das Kolon und damit die Entzündung signifikant verringert werden, sondern auch eine 40-prozentige Reduktion der Zahl von OT-I T-Zellen in der Leber erreicht werden (Abb. 22, siehe Anhang 6.1). Zusammengenommen unterstützen diese Ergebnisse frühere Studien, die ebenso eine wichtige Rolle von Integrinen für die Migration extrahepatisch aktivierter CD8 T-Zellen in die Leber beschreiben (John und Crispe, 2004; Sato *et al.*, 2006) und untermauern die Hypothese, dass die in der Leber von PSC-Patienten beschriebenen Infiltrate von aktivierten T-Zellen mit einem Darm-*Homing* Phänotyp (Grant *et al.*, 2001) eine direkte Folge der chronischen Darmerkrankung sind.

4.3.1 Immunität und Toleranz in der Leber

Die Häufigkeit der in der Leber vorgefundenen Lymphozyten resultiert nicht nur aus der Rate, mit der die Zellen in die Leber rekrutiert werden, sondern spiegelt ein dynamisches Gleichgewicht von Ein- und Austritt sowie Proliferation und Apoptose der Zellen wider (Klugewitz *et al.*, 2004). Dabei besitzt die Leber eine große Kapazität zur Induktion lokaler und systemischer Toleranz. So führt die Präsentation eines Antigenes auf LSEC oder KC ohne weitere co-stimulatorische PRR-Signale durch PAMPs/DAMPs zur Fas- und PD-1 vermittelten Apoptose von T-Zellen. Diese Kapazität ist jedoch begrenzt, so dass eine große Anzahl von Effektor-T-Zellen die tolerogenen Signale überwinden können und (Effektor-) Gedächtnis-Zellen nicht in ihrer Funktion beeinträchtigt werden (Holz *et al.*, 2010a). Demgegenüber kann die lokale Expression eines Antigenes auch zu einer vollständigen Differenzierung von adoptiv transferierten naiven CD8 T-Zellen zu Effektorzellen führen (Derkow *et al.*, 2007; Klein und Crispe, 2006). Dabei hängt es von der Menge des Antigenes, der Präsentation und der Stärke des TCR-Signals ab, ob Toleranz oder Immunität induziert werden (Tay *et al.*, 2014).

Vor allem T-Zellen mit hochaffinen TCR werden im tolerogenen Milieu der Leber durch FasL- und PD-L1-Signale durch Apoptose deletiert, während T-Zellen mit

niedrigaffinen TCR überleben (Kuniyasu *et al.*, 2004; Kuniyasu *et al.*, 2005). Dadurch wird die Zahl der Effektorzellen reduziert, was als *Killing Field*-Hypothese bezeichnet wird (John und Crispe, 2004). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete B220-Expression in den periduktulären Infiltraten von IFABP \times ASBT-OVA Mäusen könnte also nicht nur auf die Existenz von B-Zellen, sondern auch auf apoptotische CD8 T-Zellen hinweisen, da B220 auf diesen vermehrt auftritt (Oka *et al.*, 2000; Renno *et al.*, 1998). Dies ließe sich mittels weiterer Marker, wie aktive Caspase-3 für Apoptose oder CD19 für B-Zellen näher spezifizieren. Eine vermehrte Apoptose der OT-I T-Zellen in der Leber wäre jedoch aufgrund des tolerogenen IL-10 reichen Milieus und der Präsentation des endogenen Antigens ohne Co-Stimulation nicht unerwartet. In diese Richtung weisen auch die weiter oben erwähnte Reduktion der IFN- γ produzierenden OT-I Effektorzellen in der Leber von ASBT-OVA Mäusen mit OVA-Kolitis gegenüber Wildtyp-B6 Mäusen sowie in IFABP \times ASBT-OVA gegenüber IFABP-OVA Mäusen. Der Verbleib und Phänotyp der OT-I T-Zellen im weiteren Zeitverlauf ist jedoch noch unklar. Insbesondere die für den Übergang zu einer chronischen Cholangitis notwendigen Ereignisse sind dabei von großem klinischen Interesse. Zusätzlich zu den bekannten genetischen und äußeren Suszeptibilitätsfaktoren, welche die Antigenpräsentation, NK-Zell-Funktionen, Zytokine, Chemokine und Zelladhäsionsmoleküle betreffen sowie die Gallensäure- und Cholesterin-Homöostase regulieren (Pollheimer *et al.*, 2011a), sind anhand der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten dafür wahrscheinlich Störungen in der Induktion oder der Wirkung regulatorischer T-Zellen und anderer peripherer Toleranzmechanismen wie dem PD-1 Signalweg von besonderer Bedeutung. Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass bei Patienten mit PSC (Koyabu *et al.*, 2010) und anderen Autoimmunerkrankungen (Torgerson, 2006) die Frequenz von T_{reg} erniedrigt ist und der Mangel an FoxP3 in Scurfy Mäusen unter anderem auch zur Entwicklung von anti-mitochondrialen Autoantikörpern und einer autoimmunen Cholangitis führt (Zhang *et al.*, 2009). Demgegenüber weisen die hier verwendeten Mäuse auf dem genetischen C57Bl/6-Hintergrund keine Prädisposition für die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen auf und zeigen eine effiziente regulatorische Kontrolle der adoptiv transferierten CD8 OT-I T-Zellen, so dass in allen Experimenten die immunvermittelte Cholangitis nur transient auftritt.

4.3.2 Antigenpräsentation

Die Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von (Auto-) Antigenen durch DC spielt eine zentrale Rolle für die Induktion von Immunität oder peripherer Toleranz (Hopp *et al.*, 2014). Dabei wird die Aktivierung und Reifung von DC durch PAMP/DAMP-Kontakt oder Zytokine vermittelt, was mit einer gesteigerten Expression von MHC- und co-stimulatorischen Molekülen einhergeht und zu einer pro-inflammatorischen T-Zell-Aktivierung führt, während eine Antigenpräsentation ohne Co-Stimulation mit Toleranz und der Induktion regulatorischer T-Zellen in Verbindung gebracht wird (Hopp *et al.*, 2014).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass aus der Leber von gesunden ASBT-OVA Mäusen isolierte DC eine niedrige Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 aufweisen. Entsprechend proliferieren adoptiv transferierte OT-I CD8 T-Zellen nur schwach und differenzieren kaum zu Effektorzellen. Es ist also davon auszugehen, dass das transgen exprimierte endogene Modellantigen unter normalen Bedingungen in ASBT-OVA Mäusen von hepatischen APC aufgenommen, prozessiert und in einem tolerogenen Kontext präsentiert wird. Wie es zum Übergang zu einer immunogenen Präsentation von (Auto-) Antigenen als Voraussetzung für immunvermittelte Erkrankungen wie der PSC kommt, ist unklar. Eine aberrante Reifung und Migration von DC, die Auto-antigene präsentieren und eine Aktivierung autoreaktiver T-Zellen ermöglichen, wird jedoch bei der Pathogenese vieler Autoimmunkrankheiten vermutet (Bayry *et al.*, 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass es im Rahmen einer chronischen DSS-Kolitis zu einer Aktivierung und Reifung professioneller APC in der Leber mit einer gesteigerten Expression von CD40 und CD80 kommt, so dass das transgen exprimierte Autoantigen in einem co-stimulatorischen Kontext präsentiert wird. Adoptiv transferierte OT-I T-Zellen proliferierten verstärkt, differenzierten zu Effektorzellen und lösten transient eine immunvermittelte Cholangitis aus, wenn die ASBT-OVA Mäuse gleichzeitig unter einer chronischen Kolitis litten. Die Ursache für diesen Wechsel von Toleranz zu Immunität könnte bei den vom Darm translozierten pro-inflammatorischen Zytokinen und TLR-Liganden aus der bakteriellen Flora liegen,

welche in der vorliegenden Arbeit und in anderen Studien vermehrt in portalvenösem Blut nachgewiesen wurden (Alex *et al.*, 2009; Gabele *et al.*, 2011).

Neben DC und Kupffer-Zellen reagieren auch LSEC auf TLR-Liganden wie LPS. So sinkt das Potential von LSEC zur Aktivierung von CD4 T-Zellen durch eine Inhibition der endo-/lysosomalen Reifung, was die Antigenprozessierung zur Präsentation auf MHC-II unterdrückt (Knolle *et al.*, 1999), gleichzeitig jedoch eine mögliche Kreuzpräsentation auf MHC-I fördert (Schuette und Burgdorf, 2014). Diese Modulation der Antigenpräsentation nichtprofessioneller APC könnte für die Induktion einer immunvermittelten Cholangitis von besonderer Bedeutung sein, da in früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurde, dass LSEC hepatisches Antigen kreuzpräsentieren können (Derkow *et al.*, 2011), und nicht-knochenmarkabhängige APC adoptiv transferierte OT-I T-Zellen intrahepatisch aktivieren können (Derkow, 2011). Diese aktivierten OT-I T-Zellen wiesen zwar einen reduzierten Anteil IFN- γ positiver Effektorzellen in der Leber auf, was darauf hindeutet, dass professionelle APC für eine vollständige Aktivierung notwendig sind. In Hinblick auf die Funktion von LSEC in der Induktion und Aufrechterhaltung von (oralen) Toleranz (Carambia *et al.*, 2013; Limmer *et al.*, 2005) und ihrer Veto-Funktion bei der Aktivierung von CD8 T-Zellen durch professionelle APC in der Leber (Schildberg *et al.*, 2008), könnte die durch die chronische Kolitis induzierte Modulation der LSEC jedoch direkt die Entstehung einer immunvermittelten Cholangitis fördern.

Diese über die *Gut Homing*-Hypothese hinausgehende potentielle Verbindung zwischen chronischer Kolitis und dem Auftreten einer Cholangitis bei PSC-Patienten, erweitert die Rolle von LSEC von Vermittlern der Migration von Lymphozyten zu einer aktiven Funktion bei der Aktivierung dieser in die Leber rekrutierten Lymphozyten. Auch TLR1/2 Liganden (Liu *et al.*, 2013) sowie eine hohe Antigenkonzentration (Schurich *et al.*, 2010) können die LSEC-vermittelte spezifische Toleranzinduktion bei CD8 T-Zellen unterbrechen, so dass LSEC zur Differentiation dieser zu zytotoxischen Effektor-T-Zellen beitragen. Dabei könnte bei konstanter (Auto-) Antigenmenge aus apoptotischen Cholangiozyten die oben genannte LPS-induzierte Erhöhung des Potentials zur Kreuzpräsentation einen ähnlichen pro-inflammatorischen Effekt wie eine hohe Antigenkonzentration bewirken. In Fibrose-Modellen zeigten LSEC ebenfalls

veränderte pro-inflammatorische Eigenschaften (Connolly *et al.*, 2010), welche direkt und indirekt über DC zu einer gesteigerten CD8 T-Zell-Aktivierung sowie einer reduzierten CD4 T_{reg} Induktion führten, so dass LSEC auch eine entscheidende Rolle bei der Induktion und Aufrechterhaltung der PSC spielen könnten. Die nähere Untersuchung des Einflusses einer chronischen Kolitis auf LSEC im ASBT-OVA Modell über die in der vorliegenden Arbeit im Vordergrund stehenden Migrationsmoleküle hinaus könnte wegen des inhärent hohen Potentials von LSEC zur Induktion von regulatorischen T-Zellen (Carambia *et al.*, 2014; Kruse *et al.*, 2009) neue Interventionsmöglichkeiten bei PSC eröffnen.

Insgesamt weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass die Assoziation von PSC mit CED nicht nur im Sinne einer enterohepatischen Migration im Darm aktivierter T-Zellen bestehen könnte, sondern dass die chronische Kolitis unmittelbar in der Leber zur Veränderung des tolerogenen Mikromilieus in Richtung einer pro-inflammatorischen Umgebung beiträgt.

4.3.3 *Salmonella* Infektion

Wie im vorherigen Kapitel dargelegt, bedarf es für den Übergang von einer tolerogenen zu einer immunogenen Kreuzpräsentation endogener Antigene einen inflammatorischen Kontext. In ASBT-OVA Mäusen wird das endogene Modellantigen in der Leber im Rahmen einer chronischen Kolitis in ein pro-inflammatorisches Milieu gebracht, bei der OVA-Kolitis im Rahmen einer Ethanol-induzierten Barrierestörung. Darüber hinaus ist die gleichzeitige, transgene Expression des endogenen Modellantigens im Darm und in der Leber in IFABPxASBT-OVA Mäusen hinreichend, um durch im GALT aktivierte CD8 T-Zellen Antigen-abhängig eine immunvermittelte Cholangitis auszulösen.

Da verschiedene bakterielle und virale Infektionen des Gastrointestinaltraktes als mögliche Auslöser einer PSC beim Menschen diskutiert werden (Terjung und Spengler, 2009), wurde in der vorliegenden Arbeit eine transiente intestinale Infektion mit *Salmonella* dazu benutzt, das im Darm transgen exprimierte Modellantigen in einen inflammatorischen Kontext zu bringen und die Auswirkungen auf die Entstehung einer immunvermittelten Cholangitis zu untersuchen. Dabei begünstigte die

vorrausgehende transiente *Salmonella*-Infektion im Darm Antigen-unabhängig die Aktivierung von OT-I T-Zellen im GALT und führte zu einer vermehrten Zahl IFN- γ positiver, zytotoxischer Effektorzellen. Dies könnte durch eine unmittelbar induzierte Reifung von APC oder indirekt durch im Rahmen der gegen *Salmonella* gerichteten Immunreaktion freigesetzte Zytokine ausgelöst werden, welche sowohl auf T-Zellen als auch auf DC trans-aktivierend wirken können. Während *Salmonella* die Antigenpräsentation infizierter APC durch Interferenz mit dem MHC-II Präsentationsweg negativ beeinflusst (Qimron *et al.*, 2004) und nur in weniger als 1% der DC-Population vorkommt (Sundquist und Wick, 2005), wird gleichzeitig die Reifung des überwiegenden Anteils nicht infizierter DC durch Typ-I Interferone *in trans* induziert (Tam *et al.*, 2008), wodurch endogene Antigene co-stimulatorisch präsentiert werden können. So zeigte sich nach der *Salmonella*-Infektion in den mLN und insbesondere in der Leber von IFABP \times ASBT-OVA Mäusen auf CD11c^{high} DC eine signifikant niedrigere Expression von MHC-II, während das co-stimulatorische Molekül CD86 stärker exprimiert wurde. Diese Effekte auf die MHC-II und CD86 Expression waren auf CD8 positiven CD11c^{high} DC, welche für die Kreuzpräsentation eine besondere Rolle spielen (Shortman und Heath, 2010), noch deutlicher ausgeprägt. Dabei nimmt nach der Infektion der Anteil CD8 positiver CD11c^{high} DC in Bezug auf die Gesamtlymphozyten in der Leber zu, was auf eine bevorzugte Migration oder eine lokale Differenzierung hindeutet. Während *Salmonella* eine verstärkte Rekrutierung von CD103⁺ DC in den Darm induzieren kann (Farache *et al.*, 2013), wurde eine Migration von DC aus dem GALT in die Leber bislang nicht beobachtet, sondern nur für prä-DC aus dem Knochenmark in nichtlymphoide Organe beschrieben (Ginhoux *et al.*, 2009). Diese bei einer lokalen Infektion in die Leber rekrutieren Vorläufer-Zellen spielen eine wichtige Rolle für die hepatische Immunität gegenüber virulenten *Salmonellen*, welche sich bei einer oralen Infektion über das GALT hinaus systemisch auf Milz und Leber ausbreiten (Johansson und Wick, 2004). Es ist daher nicht vollständig auszuschließen, dass sich die verwendeten attenuierten *Salmonellen* vereinzelt über das GALT hinaus ausgebreitet haben könnten und die beobachteten Veränderungen in der Leber auf eine direkte Immunreaktion zurückzuführen sind. Um dies zu untersuchen, müssten sensitivere Methoden zur *Salmonella*-Detektion, beispielsweise mittels *Realtime* RT-PCR, herangezogen werden.

Es ist noch unklar, ob die durch *Salmonella* ausgelöste trans-Aktivierung von DC zu einer vollständigen Differenzierung von T-Zellen zu Effektorzellen führt (Curtsinger *et al.*, 2003; Joffre *et al.*, 2009; Kleindienst *et al.*, 2005). So könnten die im Rahmen der Entzündung freigesetzten Mediatoren die Aktivierung und Reifung von DC, ähnlich wie die Co-Stimulation von CD4 T_h-Zellen über CD40L, verstärken, andererseits begünstigen trans-aktivierte DC die Induktion von T_{reg} und könnten so die Toleranz gegenüber Autoantigenen fördern (Joffre *et al.*, 2009). Obgleich noch nicht im Detail untersucht, sprechen die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten dafür, dass die trans-Aktivierung von APC durchaus eine Rolle für die verstärkte Aktivierung und Differenzierung von CD8 T-Zellen im GALT spielen könnte. Der pro- oder anti-inflammatorische Effekt von trans-differenzierten DC könnte auch von der Art der Infektion und eventuellen individuellen genetischen Prädispositionen des Wirts abhängen und müsste in weiteren Experimenten näher untersucht werden.

Einen großen Einfluss könnten auch die durch *Salmonella* ausgelösten Entzündungsreaktionen des Epithels haben, die zu einer erhöhten Apoptose (Pyroptose) von Enterozyten und zur Störung der intestinalen Barriere während der Regenerationsprozesse führen (Broz *et al.*, 2012). So könnte die Infektion mit *Salmonella* die Aktivierung von CD8 T-Zellen im GALT von IFABP \times ASBT-OVA Mäusen begünstigen, indem durch den erhöhten Epithelzellumsatz vermehrt Autoantigene der absterbenden Zellen in die Präsentationsmaschinerie der APC gelangen, welche gleichzeitig durch eine Vielzahl von endogenen DAMPs und mikrobiellen PAMPs potente Reifungssignale erhalten und rekrutierte Effektorzellen lokal ein pro-inflammatorisches Zytokinmilieu erzeugen. Diese drei essentiellen Signale könnten für die verstärkte Differenzierung der OT-I CD8 T-Zellen in IFABP \times ASBT-OVA Mäusen zu Effektorzellen sorgen. Gleichzeitig senkt eine Infektion mit intrazellulären Bakterien wie *Salmonella* oder *Listeria monocytogenes* die Schwelle zur Aktivierung von CD8 T-Zellen durch eine PRR- und IL-6-vermittelte transiente Verminderung der suppressiven Kapazität von T_{reg} (Rowe *et al.*, 2012; Wing und Sakaguchi, 2010), so dass eine CD4 T-Zell-Hilfe unter den PAMP/DAMP-reichen Bedingungen und aufgrund der hohen Zahl transferierter CD8 T-Zellen im IFABP \times ASBT-OVA Modell entbehrlich wird (Umeshappa *et al.*, 2013; Wiesel und Oxenius, 2012). Darüber hinaus kann eine orale

Infektion mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten avirulenten *Salmonella*-Stamm aufgrund der starken Induktion von T_h1-Zytokinen Antigen-unabhängig eine T_h2-vermittelte allergische Immunreaktion nicht nur lokal im Darm (Eigenmann *et al.*, 2008), sondern auch in der Lunge (Wu *et al.*, 2006) inhibieren, was den großen Einfluss auf das mukosale Immunsystem unterstreicht und einen entsprechenden T_h1-Zytokin-vermittelten, unterstützenden Effekt auf die Aktivierung von CD8 T-Zellen im GALT von IFABP×ASBT-OVA Mäusen wahrscheinlich macht.

Trotz des Antigen-unspezifischen pro-inflammatorischen Effekts einer vorausgegangenen *Salmonella*-Infektion ist die Induktion einer Cholangitis von der Expression des Modellantigens in der Leber abhängig. So kommt es nur in IFABP×ASBT-OVA Mäusen zu einer verstärkten Cholangitis mit einem signifikant höheren Anstieg der ALT-Konzentration im Blut, während die *Salmonella*-vermittelte Zunahme der OT-I T-Zellen in IFABP-OVA und ASBT-OVA Mäusen nicht zu einer *Bystander* Hepatitis führt (Bowen *et al.*, 2002).

Da eine mögliche Rolle von Kreuzreaktionen bzw. molekularer Mimikry von bakteriellen und endogenen Antigenen bei der Entstehung von (auto-)immunvermittelten Erkrankungen wie UC (Kovvali und Das, 2005) und PSC (Terjung *et al.*, 2010) diskutiert wird, wurde mit Hilfe von *SmOVA* ein eventueller Einfluss des gleichzeitigen Auftretens eines bakteriellen und endogenen Antigens in inflammatorischem Kontext im Darm untersucht. Dabei trat eine verstärkte Aktivierung und Differenzierung von OT-I T-Zellen durch eine vorangegangene *SmOVA* Infektion nur in IFABP-OVA und IFABP×ASBT-OVA auf, also wenn im GALT gleichzeitig das endogene Antigen und das bakterielle Antigen vorhanden waren. Histologisch zeigte sich dabei eine leichte Kryptenhyperplasie und eine geringe Zunahme des mononukleären Infiltrates in der Lamina propria des Dünndarms, welches hauptsächlich aus CD3 positiven Zellen bestand (Abb. 23, siehe Anhang 6.1). Entgegen der Ergebnisse von Vezys *et al.* in IFABP-OVA Mäusen führte die *Salmonella*-Infektion jedoch nicht zu einer ausgeprägten Enteritis (Vezys und Lefrancois, 2002; Vezys *et al.*, 2000). Dies könnte in der natürlichen Kolonisationsresistenz gegenüber dem attenuierten *Salmonella*-Stamm begründet sein, welche die normale intestinale Flora vermittelt (Lupp *et al.*, 2007). Durch eine

Vorbehandlung mit dem Antibiotikum Streptomycin kann das Gleichgewicht der Flora so gestört werden, dass eine chronische Infektion im Kolon mit Salmonellen ermöglicht wird, die auch mit einer fibrotischen Cholangitis einhergeht (Stecher *et al.*, 2006). Allerdings wurden in der zitierten Studie andere, gegen virulente *Salmonella* resistente Mausstämmen verwendet, während die in der vorliegenden Arbeit benutzten C57Bl/6 Mäuse eine Mutation im Resistenz-Gen *Nramp1* tragen, welche sie hochsuszeptibel für virulente Salmonellen macht. Da dieses Modell es ermöglicht, sowohl die mikrobiellen als auch die Wirtsfaktoren in transgenen und *Knockout*-Mäusen (meist auf dem C57Bl/6-Hintergrund) zu untersuchen, die mit der chronischen Infektion und der Induktion einer immunvermittelten Cholangitis einhergehen, wäre es von großem Interesse dieses Modell mit Hilfe des hier verwendeten attenuierten *Salmonella*-Stammes für die Infektion in C57Bl/6 Mäusen zu adaptieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte im transgenen Mausmodell die beim Menschen beobachtete Assoziation der PSC mit Infektionen (Terjung und Spengler, 2009) nachvollzogen werden. Eine lokale bakterielle Infektion und der damit einhergehende inflammatorische Kontext im Darm verstärkte die Aktivierung von OT-I T-Zellen durch endogenes Antigen und förderte so die Entstehung einer immunvermittelten Cholangitis. Dabei könnte in Hinblick auf die durch *Salmonella*-vermittelte Dysbiose ein zusätzlicher pro-inflammatorischer Effekt entstehen, so dass es sinnvoll erscheint, die Zusammensetzung der intestinalen Flora mittels *Realtime* RT-PCR anhand der Bakterienfamilien-spezifischen ribosomalen RNA näher zu charakterisieren (Heimesaat *et al.*, 2007). Diese Dysbiose mit einer Anreicherung fakultativ aerober Bakterien, die auch bei Patienten mit CED und in Mäusen mit DSS-Kolitis beobachtet wird (Manichanh *et al.*, 2012; Nell *et al.*, 2010), scheint durch die drastische Zunahme von TLR-Liganden die Entzündung zu fördern (Erridge *et al.*, 2010), so dass die Kapazität hepatischer Toleranzmechanismen potentiell überschritten werden könnte. Unklar bleibt dabei, inwieweit eine transiente Translokationen von Bakterien und bakteriellen Bestandteilen, die CED-assoziierte Dysbiose oder eine überschießende Immunreaktion der Cholangiozyten die Pathogenese der PSC bestimmen.

Eine Dysbiose stört darüber hinaus das immunologische Gleichgewicht im GALT, da die kommensale Flora die Rekrutierung CD103⁺ DC ins Epithelium (Farache *et al.*, 2013) und die Induktion von T_{reg} (Cording *et al.*, 2013) vermittelt sowie die IgA-Sekretion stimuliert (Lindner *et al.*, 2012). Dies begünstigt auch die Besiedlung oder Infektion mit pathogenen Bakterien, wodurch durch molekulare Mimikry vermehrt Autoantikörper und immunvermittelte Erkrankungen durch kreuzreaktive T-Zellen entstehen könnten. Diese Hypothese wurde anhand einer Infektion mit *SmOVA* im IFABP \times ASBT-OVA Modell untersucht. Das bakterielle Antigen führte zusätzlich zum unspezifischen pro-inflammatorischen Effekt einer *Salmonella*-Infektion zur Induktion einer Antigen-spezifischen Kreuzreaktion von OT-I T-Zellen gegen das gleiche endogene Antigen. Mit der Zunahme der Zahl der OT-I Effektor-T-Zellen nach einer *SmOVA* Infektion wurde die immunvermittelte Cholangitis deutlich verstärkt, blieb jedoch vermutlich wegen der Induktion regulatorischer T-Zellen transient. Ein Übergang in eine chronische Kreuzreaktion ist also nur bei einer funktionellen Störung regulatorischer Moleküle unter einer kontinuierlichen Exposition mit dem initialen Antigen wahrscheinlich.

4.4 Klinischer Kontext

Das Fehlen effektiver medikamentöser Therapiemöglichkeiten der PSC ist auch ein Ausdruck des noch immer begrenzten Verständnisses der Pathogenese. Für die Pathogenese der PSC gibt es zwei unterschiedliche Hypothesen. Der *Leaky Gut*-Hypothese folgend, führt eine gestörte Darmbarriere zu einer vermehrten Translokation von Bakterien bzw. bakteriellen Bestandteilen in die Portalvene und stimuliert in der Leber Kupffer-Zellen und Monozyten zur Sekretion von Zytokinen und Chemokinen. So würden eine Cholangitis und sekundäre Wundheilungsprozesse ausgelöst, welche zu der charakteristischen konzentrischen periduktulären Fibrose führen (O'Mahony und Vierling, 2006). Jedoch sind nicht alle Symptome der PSC durch die *Leaky Gut*-Hypothese erklärbar, insbesondere der trotz enger Assoziation von PSC und Kolitis voneinander unabhängige Krankheitsverlauf. Daher steht nach der alternativen *Gut Lymphocyte Homing*-Hypothese die enterohepatische Migration ursprünglich im GALT aktivierter langlebiger Gedächtnis-T-Zellen in die Leber im Mittelpunkt der Pathogenese (Grant *et al.*, 2002).

Die in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von Tiermodellen gewonnenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass beiden Hypothesen zugrundeliegende Phänomene an der Pathogenese der PSC beteiligt sind. So zeigen in den Mausmodellen im GALT aktivierte CD8 T-Zellen wie bei PSC-Patienten, wo ca. 20% der Leber-infiltrierenden T-Zellen das Integrin $\alpha 4\beta 7$ und den Chemokinrezeptor CCR9 aufweisen (Eksteen *et al.*, 2004), entsprechend der *Gut Lymphocyte Homing*-Hypothese eine präferentielle Migration in die Leber und können eine immunvermittelte Cholangitis induzieren. Darüber hinaus kommt es in den Mausmodellen wie bei PSC Patienten zu einer starken Heraufregulation der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 auf den Endothelien der entzündeten Leber (Borchers *et al.*, 2009) sowie zu einer erhöhten hepatische Expression von CCL25 (Eksteen *et al.*, 2004). Dabei setzt die Aktivierung der Endothelien im Mausmodell eine chronische Kolitis voraus, wodurch es zu einer erhöhten Translokation von TLR-Liganden und zur Sekretion von Zytokinen aus dem Darm in das portalvenöse Blut kommt. Diese Störung der intestinalen Barriere entsprechend der *Leaky Gut*-Hypothese vermittelt jedoch nicht nur indirekt die Entzündung in der Leber, da durch die erhöhte Expression der Adhäsionsmoleküle vermehrt Lymphozyten immigrieren können, sondern induziert auch direkt die Reifung hepatischer APC, was eine lokale (Re-) Aktivierung der immigrierten (im GALT aktivierten) T-Zellen ermöglicht. Im Unterschied zu PSC-Patienten, die eine aberrante Expression von MAdCAM-1 auf dem hepatischen Endothel aufweisen (Grant *et al.*, 2001), zeigt sich bei Mäusen mit chronischer Kolitis keine Expression von MAdCAM-1 in der Leber, was mit den Ergebnissen anderer Gruppen übereinstimmt (Liaskou *et al.*, 2011) und auf eine differenzielle Regulation bei den Spezies hinweist. Da Integrine wie $\alpha 4\beta 7$ an potentiell mehrere Adhäsionsmoleküle wie MAdCAM-1 und VCAM-1 binden können und die Affinität der Integrine über Chemokinrezeptoren wie CCR9 und CXCR3 gesteuert wird (Sun *et al.*, 2014), die auf aktivierten CD8 T-Zellen vorkommen, wird bei der Maus die Migration in die Leber wahrscheinlich überwiegend durch VCAM-1 und ICAM-1 vermittelt.

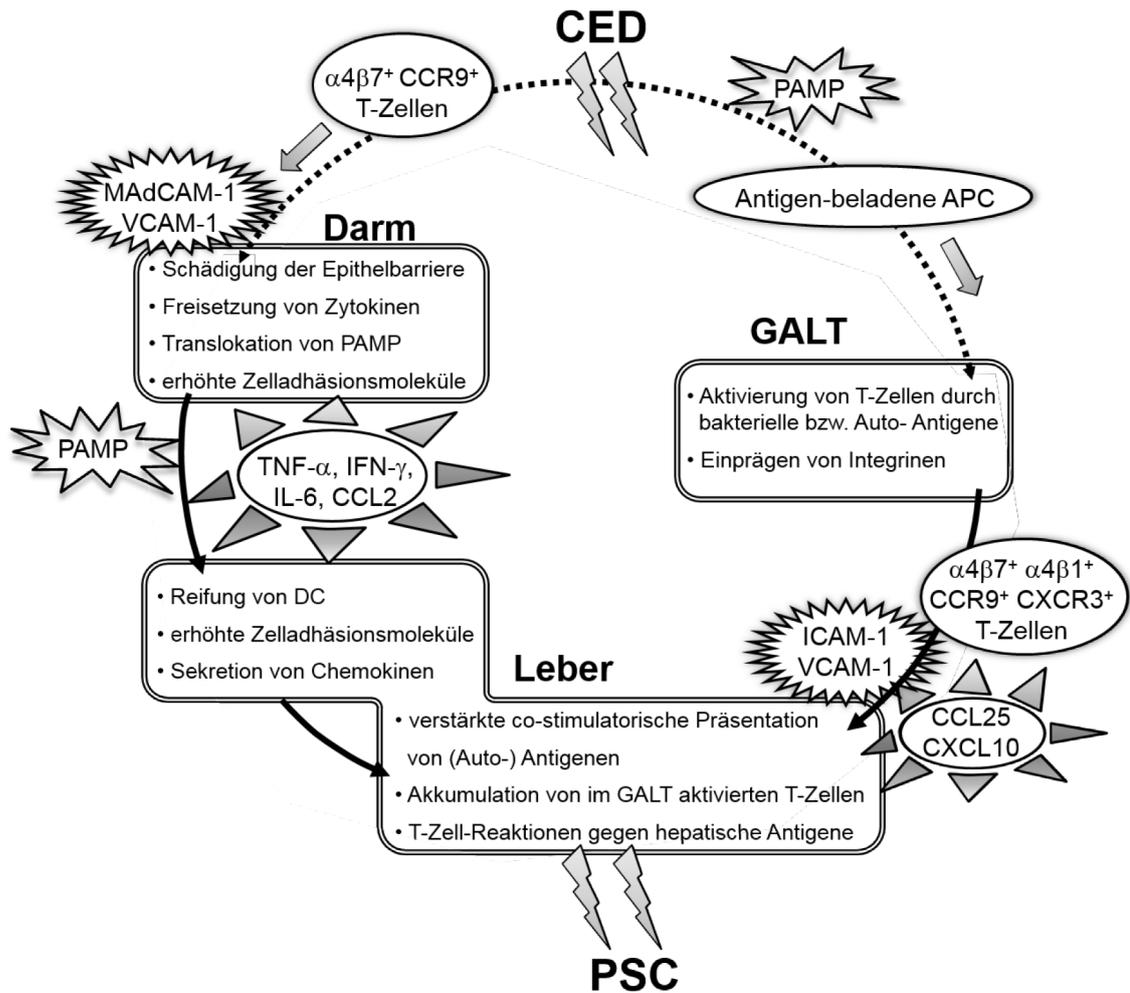


Abb. 18: Veranschaulichung des vorgeschlagenen Modells zur PSC-Pathogenese

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse sprechen demnach für einen mehrstufigen Prozess bei der Entstehung der PSC, der beide Hypothesen zu einem Modell integriert (Abb. 18). Demnach führt die Barrierestörung bzw. Dysbiose bei CED zu einer erhöhten entzündlichen Aktivität im Darm, wodurch APC reifen, migrieren und vermehrt mikrobielle und Autoantigene im GALT präsentieren. Unter den pro-inflammatorischen Bedingungen werden im GALT vermehrt T-Zellen aktiviert und ein Darm-*Homing* Phänotyp eingeprägt. Die aktivierten T-Zellen migrieren u.a. mittels $\alpha 4\beta 7$, CCR9 in den Darm und erneuern und verstärken dort die chronische Immunreaktion gegen mikrobielle bzw. Auto-antigene. Die Entzündung im Darm schädigt wiederum die Epithelbarriere und bewirkt so eine verstärkte Translokation von Bakterien und bakteriellen Produkten sowie von pro-inflammatorischen Zytokinen in das portalvenöse Blut. Die physiologischen Toleranzmechanismen der Leber werden

überlastet und es kommt zu einer erhöhten Expression u.a. von VCAM-1 und ICAM-1 sowie der Chemokine CCL25 und CXCL10. Diese vermitteln die vermehrte Migration im GALT aktivierter T-Zellen u.a. über die Integrine $\alpha 4\beta 7$ und $\alpha 4\beta 1$ sowie die Chemokinrezeptoren CCR9 und CXCR3 in die Leber, wo sie eine *Bystander*-Hepatitis auslösen können. Gleichzeitig werden auch hepatische DC aktiviert und präsentieren vermehrt Autoantigene, wodurch kreuzreaktive Gedächtnis-T-Zellen reaktiviert werden können. Diese gegen Autoantigene kreuzreaktiven T-Zellen könnten während der häufig mit PSC und CED verbundenen transienten oder chronischen Infektionen (Terjung und Spengler, 2009) durch molekulare Mimikry induziert werden und eine immunvermittelte Cholangitis auslösen, wenn die immigrierten T-Zellen ihr Antigen auf Cholangiozyten finden.

Das Autoantigen ist bei der PSC noch unbekannt, allerdings treten bei Patienten mit verschiedenen immunvermittelten Erkrankungen wie CED, autoimmuner Hepatitis und PSC vermehrt Autoantikörper wie perinukleäre anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper (p-ANCA) auf, die häufig gegen zytoplasmatische Granula-Strukturen wie Elastase, Cathepsin G und die MPO in Neutrophilen gerichtet sind. Darüber hinaus wurden in einer Studie in der Mehrheit der untersuchten PSC-Patienten atypische p-ANCA nachgewiesen, welche zwischen humanem β -Tubulin Isotyp 5 und dem bakteriellen β -Tubulin Vorläufer FtsZ kreuzreagieren, das im überwiegenden Teil der bakteriellen Flora vorkommt (Terjung *et al.*, 2010). Die humorale Immunreaktion gegen intestinale Bakterien bei CED könnte also mit dem Auftreten der biliären Entzündung bei PSC verbunden sein. Die Bindung von Autoantikörpern verstärkt in Cholangiozyten die Expression von TLR4 und TLR9, wodurch die Sensitivität gegenüber mikrobiellen Bestandteilen der Flora steigt und die Cholangiozyten aktiviert werden (Karrar *et al.*, 2007). Da Autoantikörper die Effizienz der Kreuzpräsentation des jeweiligen Autoantigens deutlich erhöhen, können sie zusätzlich die Induktion autoreaktiver CD8 T-Zellen begünstigen (Kita *et al.*, 2002). Gleichzeitig werden Auto-IgA und Auto-IgG Antikörper von den Cholangiozyten zusammen mit den normalerweise gegen mikrobielle Antigene gerichteten Antikörpern in die Gallenflüssigkeit sezerniert (Berglin *et al.*, 2013; Lenzen *et al.*, 2013), wodurch diese Autoantikörper in den Darm gelangen und dort bei der Vielzahl der potentiellen

Bindungspartner wiederum Kreuzreaktionen hervorrufen und die Selektion autoreaktiver T-Zellen fördern könnten. Ob dieser Vorgang tatsächlich stattfindet, ist noch unbekannt. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten liefern jedoch Hinweise, welche die zelluläre Immunantwort im GALT aktivierter T-Zellen mit der Induktion einer immunvermittelten Cholangitis verbinden. Die nähere Untersuchung der Rolle von Autoantikörpern für die Aktivierung von T-Zellen und die Entstehung einer Cholangitis in den hier verwendeten Mausmodellen wäre daher von großem Interesse.

Die Entzündung der Gallengänge führt zu einer *Ductular Reaction*, welche durch eine Proliferation der Cholangiozyten sowie eine erhöhte Expression von Adhäsions- und co-stimulatorischen Molekülen charakterisiert ist. Zudem verstärkt sie die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, welche autokrin und parakrin wirken, Lymphozyten und Neutrophile aktivieren (Penz-Osterreicher *et al.*, 2011). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass im GALT aktivierte T-Zellen diese sekundäre *Ductular Reaction* initiieren könnten, welche bei genetischer Prädisposition in eine selbsterhaltende chronische Entzündungsreaktion übergehen kann (Penz-Osterreicher *et al.*, 2011). Dies würde auch den von der CED unabhängigen Krankheitsverlauf der PSC und das schlechte Ansprechen auf immunsuppressive Medikamente erklären.

In dieser Hinsicht scheint ein kurative Gabe eines blockierenden anti-Integrin $\alpha 4$ Antikörpers, welcher im OVA-Kolitis-Modell die Migration in das Kolon und die Entzündung verhindern konnte sowie zu einer Reduktion der T-Zellen in der Leber führte, für Patienten wenig erfolgversprechend, da nach den vorliegenden Daten die enterohepatische Migration von T-Zellen vor allem für die Induktion der Cholangitis notwendig ist und eine PSC meist erst in fortgeschrittenem Stadium diagnostiziert wird. Eine eventuelle Antikörper-Behandlung wäre jedoch für PSC-Patienten nach einer Lebertransplantation denkbar, um einerseits eine aktive Kolitis zu behandeln und andererseits die Initiation einer erneuten Cholangitis zu unterbinden.

4.5 Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse weisen auf eine wichtige Rolle der enterohepatischen Migration im GALT aktivierter T-Zellen für die Initiation einer immunvermittelten Cholangitis hin. Von welchen Faktoren dabei die intrahepatische Lokalisation der immigrierenden Lymphozyten bestimmt wird, könnte mittels OT-I T-Zellen mit einem *Knockout* der in Frage kommenden Chemokinrezeptoren näher untersucht werden.

Ebenso ist unklar, welche Ereignisse eine transiente in eine chronische Cholangitis übergehen lassen. Dazu könnte die Induktion und Funktion regulatorischer T-Zellen und anderer peripherer Toleranzmechanismen, wie dem PD-1 Signalweg sowie die Veränderung des Phänotyps der OT-I T-Zellen im weiteren Zeitverlauf in den unterschiedlichen Kompartimenten näher charakterisiert werden. Der gleichzeitige adoptive Transfer transgener CD4 OT-II T-Zellen könnte dabei eventuell die Induktion einer immunvermittelten Cholangitis und die Differenzierung von Gedächtnis-T-Zellen als Voraussetzung für eine Chronifizierung unterstützen. In diesem Zusammenhang ist auch relevant, ob in der Leber durch periphere Toleranzmechanismen eine Apoptose der im GALT aktivierten OT-I T-Zellen ausgelöst wird, oder ob es sich bei den in der Leber von IFABP \times ASBT-OVA Mäusen gefundenen periduktulären B220⁺ Zellen tatsächlich um B-Zellen handelt, welche möglicherweise an der Bildung von pro-inflammatorischen Autoantikörpern beteiligt sein könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass eine chronische Kolitis *per se* im Mausmodell die Induktion einer Cholangitis fördert. Dabei wurde noch nicht im Detail analysiert, inwiefern die transiente Translokationen von Bakterien und bakteriellen Bestandteilen, die Kolitis-assoziierte Dysbiose oder die in die Portalvene sezernierten Zytokine die pro-inflammatorischen Veränderungen in der Leber bewirken. Insbesondere die gefundene Modulation der LSEC könnte angesichts ihres inhärenten Potentials zur Induktion regulatorischer T-Zellen und der funktionellen Beeinflussung hepatischer DC eine Rolle bei der Induktion und Aufrechterhaltung der PSC über die Steuerung der Migration von Lymphozyten hinaus spielen. Außerdem ist unklar, ob die (trans-) Aktivierung von DC im Rahmen einer chronischen Kolitis bzw. einer lokalen

Salmonella-Infektion einen pro- oder anti-inflammatorischen Effekt auf die Differenzierung autoreaktiver T-Zellen im GALT und in der Leber hat.

Um die Pathogenese der PSC im Detail zu verstehen und neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln, sind die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse ein erster wichtiger Schritt. Für eine frühere Diagnose wäre insbesondere die Charakterisierung neuer Marker von großem klinischen Interesse, um die hier dargestellten frühen entzündlichen Prozesse zu behandeln, bevor sie in eine chronische Cholangitis übergegangen sind.

5. Material und Methoden

5.1 Materialien und Geräte

5.1.1 Chemikalien

Name	Bezugsquelle
Agarose	Serva, Heidelberg
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bovines Serum Albumin Grade V	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Carboxymethylzellulose (<i>high viscosity</i>)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
CFDA-SE (5-,6-Carboxyfluorescein-diazetat-succinimidylester)	Invitrogen, Karlsruhe
Chloroform (Trichlormethan)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Citrat (Natriumsalz)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dextransulfat (DSS) 36-50kDa (Lot 6683K)	MP Biomedicals, Santa Ana, USA
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Dako, Hamburg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
dNTP Mix (10mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formaldehydlösung (4%, stabilisiert)	Herbeta Arzneimittel, Berlin
GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder	Fermentas, Schwerte
Glycerin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GolgiStop (Monensin)	Becton Dickinson, Heidelberg
Hämalaunblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropanol (Propan-2-ol)	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Neufuchsinrot	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

OVA ₂₅₇₋₂₆₄ Peptid (SIINFEKL)	Institut für Biochemie, HU Berlin
Ovalbumin Grade V	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pellet Paint Co-Präzipitant	Novagen, Billerica MA, USA
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Roti-Histol (Xylolersatz)	Carl Roth, Karlsruhe
Random Hexamer Primer	Invitrogen, Karlsruhe
Saponin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tri-(Hydroxymethylaminomethan) (Tris)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TRIzol Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Trypan-Blau Lösung (0,4 %)	Biochrom, Berlin
Tween20 (Polyethylensorbitan Monolaurat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Wasser (Nuklease-frei; ultrarein)	Invitrogen, Karlsruhe
Xylazinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

5.1.2 Medien, Lösungen und Puffer

Name	Zusammensetzung/Bezugsquelle
30%, 70%, 80% Ethanol	v/v in Nuklease-freiem Wasser
50%, 70%, 80%, 90% Ethanol	v/v in deionisierten Wasser (18M Ω -cm)
Ampicillin (100mg/ml)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Citrat-Puffer (pH 6,0)	10mM Citrat (Natriumsalz)
Erythrozyten-Lyse-Puffer (pH 7,4)	1M KHCO ₃ , 150mM NH ₄ Cl, 0,1mM EDTA
FACS-Puffer	PBS mit 0,5% BSA, 0,05% Natriumazid
Fixierungspuffer (pH 7,4)	PBS mit 0,5% (v/v) Formaldehyd
Fötales Kälberserum (FCS) Superior	Biochrom, Berlin
Gentamycin	Biochrom, Berlin
Heparin (5.000U/ml)	Roche, Mannheim
HEPES-Puffer (1M)	Biochrom, Berlin
Ketaminhydrochlorid (50mg/ml) Lösung	Actavis, Langenfeld
L-Glutamin (200mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Luria-Bertani (LB) Medium/Agar	SIFIN, Berlin
MACS-Puffer	PBS mit 0,5% BSA, 2mM EDTA
Penicillin/Streptomycin (10.000U/10mg/ml)	Biochrom, Berlin

Percoll Separationslösung (Dichte 1,124 g/ml)	Biochrom, Berlin
Phosphate buffered saline (PBS) ohne Mg ²⁺ /Ca ²⁺	PAA, Cölbe / Invitrogen, Karlsruhe
PBS/FCS	PBS mit 1% (v/v) FCS
PBS/FCS/DTT	PBS mit 2% (v/v) FCS, 1mM DTT, 2mM EDTA
PBS/BSA	PBS mit 0,5% (w/v) BSA
Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) Medium	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI+	RPMI 1640 supplementiert mit 2mM Glutamin, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 50µM β-Mercaptoethanol, 10% FCS
TAE-Puffer für Gelelektrophorese (pH 8)	40mM Tris, 20mM Essigsäure, 1mM EDTA
Tissue-Tek	Sakura Finetek, USA
Tris-Puffer (pH 7,4)	50mM Tris/HCl, 150mM NaCl
Verdaumedium	RPMI 1640 mit 10mM HEPES, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 50mg/ml Gentamycin, 50µM β-Mercaptoethanol, 10% FCS, 20U/ml Collagenase D, 40mg/ml Collagenase VIII
Willie-Puffer (pH 8,5)	100mM Tris, 200mM NaCl, 10mM EDTA, 0,2% SDS
Xylose-Lysin-Desoxycholat (XLD) Agar (Salmonellen-selektiv)	SIFIN, Berlin

5.1.3 Enzyme und Kits

Name	Bezugsquelle
CBA <i>Multiplex Mouse Inflammation Kit</i>	BD Biosciences, Heidelberg
CD8α ⁺ <i>T-Cell-Isolation Kit II</i>	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
Collagenase D	Roche, Mannheim
Collagenase VIII	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNase I	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Red Load Taq Mastermix (<i>high yield</i>)	Jena Bioscience, Jena
RNaseOUT (rekombinanter RNase Inhibitor)	Invitrogen, Karlsruhe
SsoFast Universal Eva-Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, München
SuperScript III (Reverse Transkriptase)	Invitrogen, Karlsruhe

5.1.4 Primer

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden durch die Firma TIB-MolBiol (Berlin) hergestellt.

Name	Sequenz (5'-3')
mCCL25_185F	CTGTGAGATTCTACTTCCGCCA
mCCL25_292R	TCCAGTGGACTAGCCTTTTCCTA
mCXCL10-247F	CCACGTGTTGAGATCATTGCC
mCXCL10-365R	GCCCTTTTAGACCTTTTTTGGC
mICAM-I_628F	AGCCTCCGGACTTTCGATCTT
mICAM-I_744R	AGAGGCAGGAAACAGGCCTT
mIL-18_275F	TGGCCGACTTCACTGTACAACCG
mIL-18_401R	GGTCTGGGGTTCCTGGCACTT
mMadCam-1_42F	CCCTACCAGCTCAGCAGAGGACA
mMadCam-1_166R	ACCCGGGCTACACCCTCGTC
mRPL4_772F	GTGGGCATGTGGGCCGTTTCT
mRPL4_977R	GCGATGAATCTTCTTGCCTGGTGC
mTNFa_281F	ACGTCGTAGCAAACCACCAAGT
mTNFa_392R	GCTGGCACCCTAGTTGGTTGT
mVAP-1_2010F	TGGAGAGGACTTGGTAGCCTG
mVAP-1_2126R	TTATACGGCCGGAGGAAGAA
mVCAM-I_1407F	GGGGGCCAAATCCACGCTTGT
mVCAM-I_1533R	AGGGAATGAGTAGACCTCCACCTGG
OVAup	CAAGCACATCGCAACCA
OVAdown	GCAATTGCCTTGTGAGCAT
IFABP	GCCATCACACTTGACCCTAA
OVA800	TCAGGCAACAGCACCAACAT

5.1.5 Antikörper

Spezifität	Fluorochrom	Klon, Spezies Isotyp	Bezugsquelle
CCR5 (CD195)	Biotin	HM-CCR5, Armn. Hamster IgG	Biologend
CCR9	PE	9B1/CW-1.2, Maus IgG2a	eBioscience
CD3ε	FITC	145-2C11, Armn. Hamster IgG	eBioscience
CD4	FITC, PE, PerCP	RM 4-5, Ratte IgG2a, κ	BD Pharmingen
CD8α	FITC, PerCP, APC, APC-H7	53-6,7, Ratte IgG2a, κ	eBioscience
CD11c	FITC, PE	HL3/N418, Arm. Hamster IgG1	BD Pharmingen
CD16/32 (Fcγ)	gereinigt	93, Ratte IgG2a, λ	eBioscience
CD19	PE	MB 19-1, Maus IgA, κ	eBioscience
CD29 (β1)	PE, Pacific Blue	Hmβ 1-1, Armn. Hamster IgG	Biologend
CD40	Biotin	HM40-3, Armn. Hamster IgM	eBioscience

CD44	Biotin, PE, APC	IM7, Ratte IgG2b, κ	eBioscience
CD45R (B220)	Biotin, APC	RA3-6B2, Ratte IgG2a, κ	eBioscience
CD49d (α4)	Biotin	9C10 (MFR 4.B), Ratte IgG2a, κ	Biolegend
CD62L	FITC, PE	MEL-14, Ratte IgG2a, κ	Biolegend
CD69	FITC, PE	H1.2F3, Armn. Hamster IgG1	eBioscience
CD80	PE	16-10A11, Armn. Hamster IgG	eBioscience
CD86	APC	GL1, Ratte IgG2a, κ	eBioscience
CD90.1 (Thy1.1)	FITC, PE, V450	HIS51, Maus IgG2a, κ	eBioscience
CD183 (CXCR3)	APC	CXCR-173, Ratte IgG2a	Biolegend
CD279 (PD-1)	PE	J43, Armn. Hamster IgG	eBioscience
F4/80	PE, APC	BM8, Ratte IgG2a, κ	eBioscience
Foxp-3	APC	FJK-16a, Ratte IgG2a, κ	eBioscience
IFN-γ	APC	XMG 1.2, Ratte IgG1, λ	eBioscience
IL-2	PE	JES6-5H4, Ratte IgG2b, κ	eBioscience
IL-10	PE	JES5-16E3, Ratte IgG2b	eBioscience
IL-17A	APC	eBio17B7, Ratte IgG2a, κ	eBioscience
LPAM-1 (α4β7)	Biotin, PE	DATK32, Ratte IgG2a, κ	eBioscience
MHC-I	APC	AF6-88.5.5.3, Maus IgG2a, κ	eBioscience
MHC-I-OVA ₂₅₇₋₂₆₄	Biotin	eBio25-D1.16, Maus IgG1, κ	eBioscience
MHC II	Biotin	M5/114.15.2, Ratte IgG2b, κ	eBioscience
NK 1.1	Biotin	PK136, Maus IgG2a, κ	eBioscience
Streptavidin	FITC, PE, PerCP, APC		eBioscience
TCR Vα2	FITC, PE, APC, V450	B20.1, Ratte IgG2a, λ	eBioscience
Isotyp Arm. Hamster IgG	Biotin, FITC, PE, APC, Pacific Blue	eBio299/Arm, HTK888	eBioscience/ BioLegend
Isotyp Maus IgG2a	Biotin, PE, V450	eBM2a	eBioscience
Isotyp Ratte IgG1, κ	Biotin, PE, APC	RTK 2071	eBioscience/ BioLegend
Isotyp Ratte IgG2a	Biotin, FITC, PE, APC	RTK 2758	eBioscience/ BioLegend
Isotyp Ratte IgG2b	Biotin, FITC, PE, APC	eB1 49/10H5	eBioscience

5.1.6 Immunhistochemie

Spezifität	Verdünnung	Nummer, Spezies	Bezugsquelle
CD3ε	1:300	N1580, Kaninchen	Dako
CD8α	1:100	14-0081, Ratte	eBioscience
CD45R (B220)	1:200	RA3-6B2, Ratte	eBioscience
CD90.1 Biotin	1:100	202501, (OX7), Maus	Biolegend
CK19	1:400	EPNCIR127B, Kaninchen	Abcam
F4/80	1:100	14-4801, Ratte	eBioscience

FoxP3	1:100	14-5773, Ratte	eBioscience
MPO7	1:500	A0398, Kaninchen	Dako
anti-Kaninchen (biotinyliert)	1:200	711-065-152, Esel	Dianova
anti-Ratte (biotinyliert)	1:1000	312-065-003, Kaninchen	Dianova
ABC-Kit		K5005	Dako
EnVision Peroxidase Rabbit Kit DAB+		K406511-2	Dako
Streptavidin-Alkalische Phosphatase		K0391	Dako
Peroxidase-Blockierungsreagenz		S2023	Dako

5.1.7 Verbrauchsmaterialien

Name	Bezugsquelle
6-well Zellkulturplatte (9cm ²)	Corning, Amsterdam, Niederlande
96-well optische Reaktionsplatte	Applied Biosystems, Darmstadt
Einmal-Kanülen 26G (0,45x13mm), 25G (0,5x25mm)	Becton Dickinson, Heidelberg
Einmal-Mikrotom Klingen (R 35)	Feather, Osaka, Japan
Einmal-Spritzen (steril) 1,5ml, 5ml, 10ml	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Röhrchen (steril)	Becton Dickinson, Heidelberg
FastRNA Green Lysing Matrix D	MP Biomedicals, Santa Ana, USA
Hämatokrit-Kapillaren, Glas heparinisiert	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Kapillarblutentnahmegefäß mit 200µl Lithium-Heparin-Trenngel (GK 150)	Kabe Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth
MACS Separationssäulen LS	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
Neubauer Zählkammer	LO-Laboroptik, Friedrichsdorf
Objektträger Superfrost Plus	VWR, International, Darmstadt
Objektträger Dako REAL	Dako, Hamburg
PCR-Reaktionsgefäße 0,2ml	Biozym, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäße 0,5ml, 1,5ml, 2ml	Eppendorf, Hamburg
Schraubröhrchen (15ml/50ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterile Mikropipetten mit Aerosolfilter (nukleasefrei)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Sterile Plastikpipetten 2,5ml, 5ml, 10ml, 25ml	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter Nalgene 500ml	Nalge Nunc, Rochester, USA
Venenverweilkanüle Venflon (1,8x45mm)	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkultur-Flachröhrchen (10cm ²)	TPP, Trasadingen Schweiz
Zellkultur-Flaschen (15cm ² /75cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellsieb CellTrics (30µm)	Partec, Münster
Zellsieb (70µm)	Becton Dickinson, Heidelberg

5.1.8 Geräte

Name	Bezugsquelle
ABI Prism 7500 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Brutschrank Autoflow	NuAire, Plymouth, USA
Brutschrank Labotect Inkubator C2000	Labotect, Göttingen
CFX96 Touch RT-PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories, München
Cryostat 2800 Frigocut E	Reichert-Jung, Nussloch
Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Durchflusszytometer FACSCanto II	Becton Dickinson, Heidelberg
Einbettautomat Hypercenter XP Tissue Processor	Shandon, Frankfurt
Einbettstation	Microm, Walldorf
Fastprep-Gerät FP120	MP Biomedicals, Santa Ana, USA
Fluoreszenzmikroskop mit Kamera	Leica/Olympus
Horizontal-Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories, München
Kolbenhubpipetten	Eppendorf, Hamburg
Labtherm (Bakterieninkubator)	Kühner, Birsfelden, Schweiz
MidiMACS-Magnet und MACS-Ständer	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Mikrotom HM355S	Microm, Walldorf
Nanodrop 1000	Thermo Scientific, Schwerte
Polymax 1040 (Schwenkapparatur)	Heidolph Instruments, Schwabach
PowerPac 300 (Spannungsversorgung)	Bio-Rad Laboratories, München
Sorter FACSAria II	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilwerkbank LaminAir HBB 2448	Heraeus Instruments, Hanau
Thermocycler GeneAmp PCR System 9600	PerkinElmer, Waltham, USA
Thermoschüttler compact	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
UV-Transilluminator	Bioblock Scientific, Illkirch, Frankreich
Ultra Turrax	IKA Labortechnik, Staufen
Vortex-Mischer	VWR International, Darmstadt
Waage CS200 (200g±0,1g)	Ohaus, Nänikon, Schweiz
Wasserbad Julabo U3	Julabo Labortechnik, Seelbach
Zentrifuge Megafuge 2.0R	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich, Tuttlingen

5.2 Tiere

5.2.1 Transgene Mausstämmen und Zucht

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten ASBT-OVA Mäuse, die in Cholangiozyten das Modellantigen Ovalbumin exprimieren, wurden von Eckart Schott hergestellt (Derkow *et al.*, 2007). Der Vektor pASBT-OVA basiert auf dem pBluescript Vektor und enthält den *Apical Sodium Dependent Bile Transporter* (ASBT)-Promotor, ein Fusionskonstrukt, das für die transmembrane Domäne des Transferrin-Rezeptors und ein 246 Aminosäurereste langes Fragment des Proteins Ovalbumin (139-385) kodiert, sowie eine poly-A Sequenz. Das Ovalbuminfragment enthält die für CD8 und CD4 T-Zellen immundominanten MHC-I und MHC-II Epitope (Abb. 19). Das linearisierte Konstrukt (KpnI/NotI-Fragment) wurde für die Mikroinjektion in Vorkerne von befruchteten C57BL/6 Eiern verwendet. Die Tiere wurden regelmäßig mit Wildtyp C57BL/6J Mäusen gekreuzt und vor der Verwendung das Vorhandensein des Transgens mittels PCR geprüft.

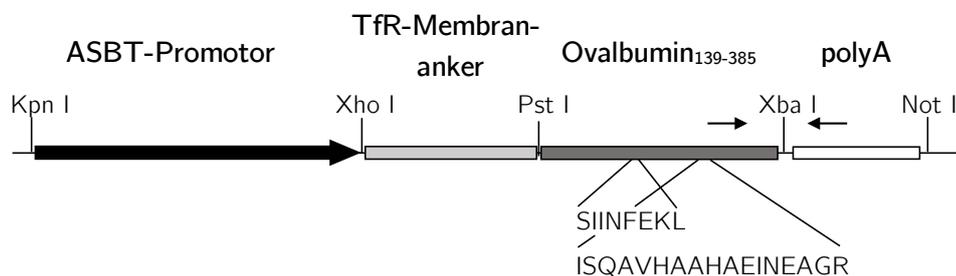


Abb. 19: Schematischer Aufbau des ASBT-OVA Konstrukts

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten IFABP-OVA Mäuse wurden von Leo Lefrançois zur Verfügung gestellt (Vezys *et al.*, 2000). Sie exprimieren in Enterozyten des Dünndarms das Modellantigen Ovalbumin. Das Konstrukt enthält den *Intestinal Fatty Acid-Binding Protein* (IFABP)-Promotor, ein 198 Aminosäurereste langes Fragment des Proteins Ovalbumin (138-336) sowie zur Steigerung der Expressionseffizienz ein Fragment des *Human Growth Hormone*, mit einer poly-A Signalsequenz (Abb. 20). Das Fusionsprotein enthält keine Signalsequenz und liegt zytoplasmatisch vor. Das linearisierte Konstrukt (Sal I-Fragment) wurde für die Mikroinjektion in Vorkerne von befruchteten C57BL/6J Eiern verwendet. Die Tiere

wurden regelmäßig mit Wildtyp C57BL/6J Mäusen gekreuzt und vor der Verwendung das Vorhandensein des Transgens mittels PCR geprüft.

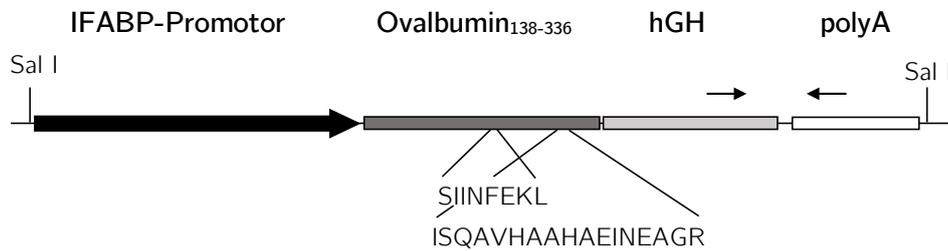


Abb. 20: Schematischer Aufbau des IFABP-OVA Konstrukts

Durch Kreuzung von IFABP-OVA Männchen mit ASBT-OVA Weibchen wurden IFABP \times ASBT-OVA Mäuse erzeugt, wobei die F1-Generation nach der Prüfung auf das Vorhandensein der Transgene mittels PCR für die Experimente verwendet wurde.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Rag1^{-/-} OT-I⁺ Thy1.1⁺ Mäuse wurden durch Kreuzung von OT-I⁺ Thy1.1⁺ Männchen mit Rag1^{-/-} Weibchen und weiterer Verpaarung der Rag1^{+/-} F1-Generation (Nichtgeschwister) erzeugt. Ursprünglich wurden OT-I Mäuse durch Klonierung der T-Zellrezeptorketten aus einem OVA_{257–264} spezifischen CD8 T-Zell Klon (149.42) generiert (Hogquist *et al.*, 1994). Der kongene Marker Thy1.1 dient zur Identifizierung der transferierten T-Zellen in Thy1.1⁻ Thy1.2⁺ Tieren mit C57Bl/6J Hintergrund. Die Tiere wurden durchflusszytometrisch auf das Vorhandensein des Transgens geprüft, bevor sie für Experimente verwendet wurden.

5.2.2 Tierhaltung

Die Stämme ASBT-OVA, IFABP-OVA, IFABP \times ASBT-OVA, Rag1^{-/-} OT-I Thy1.1 und C57BL/6J Wildtyp-Mäuse wurden in der zentralen Tierhaltung der Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin (FEM, Berlin) gezüchtet und spezifisch Pathogen-frei (SPF) in individuell ventilierten Käfigen (IVC) gehalten. In einem Alter von 8-12 Wochen wurden die Tiere für Experimente eingesetzt. Alle Experimente waren im Rahmen der Tierversuchsvorhaben mit den Antragsnummern G0115/07 und G0049/10 vom zuständigen Landesamt für Gesundheit und Soziales genehmigt. Alle Tierversuche wurden im Einklang mit dem Tierschutzgesetz und behördlichen Genehmigungen durchgeführt.

Zum Abschluss der Experimente wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und Milz, mesenteriale Lymphknoten, Leber, Dünndarm und Kolon entnommen. Gegebenenfalls wurden für die Immunhistologie und eine spätere RNA-Isolation Gewebeproben in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

5.2.3 Genotypisierung

Mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde das Vorhandensein des Transgens in ASBT-OVA, IFABP-OVA und IFABPxASBT-OVA Mäusen qualitativ nachgewiesen. Dazu wurden Ohrbiopsien von 1,5mm Durchmesser oder 3-5mm lange Schwanzspitzenbiopsien in 150 μl Verdaupuffer mit 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Proteinase K für zwei Stunden bei 56°C , 950rpm auf einem Thermoschüttler inkubiert und nach dem Verdau die Proteinase 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Proben wurden mit Nuklease-freiem Wasser auf 1ml aufgefüllt und 1 μl für die PCR eingesetzt.

Für die PCR wurde 1 μl Biopsielysat zu einem Mastermix aus jeweils 1 μl OVAup- und OVAdown-Primer bzw. IFABP- und OVA800-Primer (10 μM) sowie 5 μl *Red Load Taq Mastermix* und 17 μl Nuklease-freiem Wasser gegeben. Der *Red Load Taq Mastermix* enthält alle für die PCR notwendigen Reagenzien, inklusive einem Ladepuffer für die Agarose-Gelelektrophorese. Als Positivkontrolle dienten zuvor positiv getestete Biopsielysate und als Negativkontrolle Nuklease-freies Wasser. Die PCR lief nach folgendem Protokoll:

Initiale Denaturierung:	94 $^{\circ}\text{C}$ für 2min	
Denaturierung:	94 $^{\circ}\text{C}$ für 30sek	} 30x
Primeranlagerung:	55 $^{\circ}\text{C}$ für 30sek	
Elongation:	72 $^{\circ}\text{C}$ für 1min	
finale Elongation:	72 $^{\circ}\text{C}$ für 10min	
Kühlung/Lagerung:	4 $^{\circ}\text{C}$	

Die amplifizierte DNA wurde mittels Gelelektrophorese nach ihrer Größe getrennt. Dazu wurde 1,5% (w/v) Agarose in 150ml TAE-Puffer in der Mikrowelle erwärmt und nach 15 Minuten abkühlen 7,5 μl Ethidiumbromid (10mg/ml) hinzugefügt. 15 μl jeder Probe oder 5 μl des DNA-Größenmarkers wurden in die Geltaschen

gegeben und bei 110V in TAE als Laufpuffer für ca. 20 Minuten aufgetrennt. Auf einem UV-Transilluminator wurden die fluoreszierenden DNA-Banden dokumentiert und die Größe anhand des DNA-Größenmarkers abgeschätzt.

5.2.4 Phänotypisierung

Um in Rag1^{-/-} OT-I Thy1.1 Mäusen das Vorhandensein der Transgene bzw. *Knockout* zu überprüfen, wurde den Tieren ein Tropfen Blut entnommen und in ca. 100µl PBS (10U/ml Heparin) aufgenommen. Die Proben wurden bei 4°C, für 5 Minuten bei 950xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um die im Zellpellet vorhandenen Erythrozyten zu entfernen, wurde das Pellet in 0,5 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 1 ml PBS/BSA und Zentrifugation für 5 Minuten bei 950xg wurden die Zellen gewaschen. Dieser Erythrozyten-Lyse-Schritt wurde einmal wiederholt. Anschließend wurden die Oberflächenmoleküle B220, TCR Vα2 und CD90.1 wie in 5.8 beschrieben gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. In Rag1^{-/-} Tieren sind die Blutzellen B220 negativ (keine B-Zellen vorhanden), OT-I positiv sind die Tiere, wenn >20% der Blutzellen TCR Vα2 positiv sind, und CD90.1 positive Zellen tragen den kongenen Marker.

5.3 Kolitis-Modelle

5.3.1 OVA-Kolitis

Um CD8 T-Zellen Antigen-spezifisch im GALT zu aktivieren, wurde ein neues Kolitis-Modell entwickelt. Zunächst wurde durch die rektale Gabe von Ethanol die vor der bakteriellen Flora schützende Schleimschicht wird dabei vorübergehend soweit reduziert, dass das nachfolgend rektal applizierte Ovalbumin bzw. als Kontrolle Rinderserumalbumin in direkten Kontakt mit der Epithelzellschicht treten können. Es wird angenommen, dass die Modell-Antigene zusammen mit bakteriellen Bestandteilen aufgenommen, prozessiert und präsentiert werden. Um die Verweildauer des OVA/BSA Einlaufs im Kolon zu erhöhen, wurde die Viskosität der Lösung mittels Carboxymethylzellulose erhöht. Carboxymethylzellulose verhält sich biochemisch inert und wird nicht vom Darm aufgenommen. Um das Lumen des *Kolon descendenz*

weitgehend von Fäzes zu befreien, wurde durch abdominale Massage eine Defäkation herbeigeführt. Nach der intrarektalen Ethanolapplikation wurden naive OT-I CD8 T-Zellen intravenös transferiert.

Etwa 20g schwere Mäuse wurden mit Ketamin/Xylazin (75mg/7,5mg pro kg Körpergewicht *i.p.*) leicht narkotisiert und mittels einer flexiblen Venenverweilkanüle 150µl 30% (v/v) Ethanol intrarektal appliziert. Nach 30 Minuten wurden 40mg OVA bzw. BSA in 200µl einer 0,9% (w/v final) wässrigen Carboxymethylzellulose-Lösung intrarektal appliziert. Zum gleichen Zeitpunkt wurden ca. 6 Millionen mittels MACS isolierte, naive RAG1^{-/-} OT-I CD8 T-Zellen in 200µl PBS *i.v.* transferiert und den Tieren Blut entnommen.

5.3.2 *In vivo* Behandlung mit blockierenden Antikörpern

Der Antikörper-Klon PS/2 bindet an die Integrine $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha 4\beta 7$ gleichermaßen und blockiert die Integrin-abhängige Migration *in vivo* (Andrew *et al.*, 1994; Lobb und Hemler, 1994). Um die Migration von Lymphozyten mittels der $\alpha 4$ -Integrine $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha 4\beta 7$ zu untersuchen, wurden Mäuse jeden zweiten Tag, beginnend einen Tag vor dem adoptiven Transfer von OT-I T-Zellen mit 15mg/kg Körpergewicht des blockierenden anti- $\alpha 4$ Integrin Antikörpers (Klon PS/2) oder als Kontrolle mit einem anti-KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*) Antikörper gleichen Isotyps *i.p.* behandelt.

5.3.3 Chronische DSS-Kolitis

Der genaue Mechanismus, wie Natrium-Dextransulfat (*Dextran Sodium Sulfate*, DSS) eine Kolitis auslöst, ist noch nicht vollständig bekannt. Kürzlich wurde gezeigt, dass DSS nicht direkt toxisch auf Epithelzellen wirkt, sondern mit mittellangkettigen Fettsäuren im Lumen des Kolon Nano-Lipokomplexe bildet, die mit der Epithelzellmembran fusionieren und DSS ins Zellinnere transportieren können. Dies löst eine Entzündungsreaktion aus, die mit einer Störung der Epithelbarriere einhergeht (Laroui *et al.*, 2012).

Um in ca. 20g schweren Mäusen eine chronische Kolitis auszulösen, wurde in 3 Zyklen für jeweils 7 Tage 2% (w/v) DSS und 14 Tage normales Trinkwasser verabreicht (Okayasu *et al.*, 1990; Wirtz *et al.*, 2007). Da die DSS-Lösung bei

Raumtemperatur nur eine sehr begrenzte Haltbarkeit aufweist, wurde die Lösung in 2-tägigem Abstand gewechselt. Die Tiere wurden täglich gewogen und neben dem Gewichtsverlauf klinische Symptome wie spontanes und reaktives Verhalten, Körperhaltung und Fellpflege aufgezeichnet.

5.3.1 Adoptiver T-Zell-Transfer

Die Mäuse wurden mit Ketamin/Xylazin (100mg/10mg pro kg Körpergewicht *i.p.*) narkotisiert und ca. 6-8 Millionen naive OT-I CD8 T-Zellen *i.v.* in 200µl PBS in den retroorbitalen Venenplexus oder in die laterale Schwanzvene transferiert.

5.4 Infektion

5.4.1 Salmonellen-Infektion

Der *aroA*-defiziente Stamm *Salmonella enterica ssp. enterica ser. typhimurium SL7207 (Sm)* ist wegen der resultierenden Auxotrophie für aromatische Aminosäuren *in vivo* attenuiert, so dass eine orale Infektion von Wildtyp-B6 Mäusen zu einer transienten Infektion des Dünndarms mit einer Invasion der Peyerschen Plaques führt, es jedoch nicht zu einer systemischen Ausbreitung der Bakterien kommt (Mittrücker und Kaufmann, 2000). Um den Effekt einer zusätzlichen bakteriellen Expression des OVA₂₅₇₋₂₆₄ Peptides zu untersuchen, wurde ein mit dem Plasmid (pQE-OVA8) transformierter *Salmonella typhimurium* Stamm SL7207 verwendet, der unter dem bakteriellen T5-Promotor OVA₂₅₇₋₂₆₄ exprimiert (Qimron *et al.*, 2004). Dieser Stamm wird hier als *Salmonella-OVA (SmOVA)* bezeichnet.

Die Bakterien wurden in 250ml LB-Medium (+300mM NaCl) in einem 1l Erlenmeyerkolben über Nacht mit 90rpm schüttelnd bei 37°C kultiviert, 15 Minuten bei 3000xg, 4°C zentrifugiert, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in 33ml PBS-10% Glycerin aufgenommen und zu 1,2ml aliquotiert bei -80°C gelagert. Zur Erhaltung des Plasmids von *SmOVA* wurde dem Medium 200µg/ml Ampicillin hinzugefügt.

Zur Infektion wurde ein Aliquot rasch bei 37°C aufgetaut, mit einem Vortex-Mischer resuspendiert und 200µl-250µl je Maus mittels einer gebogenen Schlundsonde

in den Magen appliziert. Zur Bestimmung der Keimzahl wurde eine dekadische Verdünnungsreihe in kaltem PBS erstellt und je 100µl auf eine LB-Agar bzw. LB-Amp-Agar Platte ausgestrichen. Nach 24h bei 37°C wurden die Kolonien auf den Platten gezählt und die Bakteriendichte des aufgetauten Aliquots berechnet. Sie betrug stabil für *Sm* ca. $8,8 \cdot 10^9$ Kolonie-bildende Einheiten (KBE)/ml und für *SmOVA* ca. $8,3 \cdot 10^9$ KBE/ml.

Um nach der Infektion die Zahl der Bakterien in den Organen abzuschätzen, wurden die Organe in PBS/FCS homogenisiert, eine serielle Verdünnungsreihe in PBS erstellt und auf XLD-Agar- bzw. XLD-Amp-Agar Platten ausgestrichen. Um *Salmonellen* im Faeces nachzuweisen, wurde der gewogene Faeces in 1ml kaltem PBS mittels eines konischen Kunststoffmörser in einem 1,5ml Reaktionsgefäß homogenisiert und eine serielle Verdünnungsreihe auf XLD-Agar- bzw. XLD-Amp-Agar Platten ausgestrichen. Nach 24h bei 37°C wurden die Kolonien gezählt und die Keimzahl bezogen auf das Gewicht des Ausgangmaterials berechnet.

5.5 Endoskopie

Die endoskopische Untersuchung der Mäuse ermöglichte den Krankheitsverlauf der Kolitismodelle zu verschiedenen Zeitpunkten schonend in dem gleichen Tier zu verfolgen und semi-quantitativ zu erfassen. Dazu wurden die Tiere mit Ketamin/Xylazin (100mg/10mg pro kg Körpergewicht) betäubt und mit einem Miniaturendoskop das *Kolon deszendenz* bis zum *Kolon transversum* untersucht. Für die spätere unabhängige, semiquantitative Auswertung wurde das Videomaterial aufgezeichnet und mit VirtualDub Einzelbilder entnommen.

Anhand der Merkmale Granularität, Vaskularität, Lichtdurchlässigkeit der Darmwand, Fibrinablagerungen und der Konsistenz des Kotes wurde die Schwere der Entzündung visuell quantifiziert. Jedes Merkmal wurde dabei mit einem Score-Wert von 0 für keine Veränderungen bis 3 für stärkste pathologische Veränderungen bewertet, so dass sich in der Summe ein Gesamtscore von max. 15 ergab.

5.6 Blutanalyse

5.6.1 Alanin-Aminotransferase

Das Enzym Alanin-Aminotransferase (ALT) kommt vor allem im Zytoplasma von Hepatozyten vor und wird bei einer Schädigung von Hepatozyten u.a. bei Entzündungsreaktionen ins Blut abgegeben, wo es detektiert werden kann.

Zum angegebenen Zeitpunkt wurden die Mäuse mit Ketamin/Xylazin (100mg/10mg pro kg Körpergewicht *i.p.*) narkotisiert und mit einer heparanisierten Hämatokrit-Glaskapillare aus dem retrobulbären Venenplexus ca. 100µl Blut entnommen. Das Blut wurde in ein Kapillarblutentnahmegefäß mit Lithium-Heparin-Trenngel überführt und zur Trennung der Blutzellen vom Plasma bei Raumtemperatur für 7 Minuten bei 6000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20°C gelagert. Zur Messung wurde das Plasma 1:2 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt und 60µl bzw. 80µl im klinischen Routinelabor der Charité vollautomatisch analysiert.

5.6.2 Zytokine in portalvenösem Blut

Um den Transfer von Zytokinen vom Darm in die Leber zu untersuchen, wurde Blut aus der den Darm mit der Leber verbindenden *Vena portae* entnommen. Dazu wurden die Mäuse mit Ketamin/Xylazin (125mg/12,5mg pro kg Körpergewicht *i.p.*) tief narkotisiert, das Abdomen ventral geöffnet, die *Vena portae* direkt unterhalb der Leber mit einer Gefäßklemme verschlossen und mit einer heparanisierten Hämatokrit-Glaskapillare punktiert. Das Blut wurde in ein Kapillar-Blutentnahmegefäß mit Lithium-Heparin-Trenngel überführt und bei Raumtemperatur für 7 Minuten bei 6000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20°C gelagert. Direkt nach der Blutentnahme wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet.

Die Plasma-Zytokin-Konzentrationen von TNF- α , IFN- γ , IL-6, CCL2, IL-12 und IL-10 wurde in Kooperation mit Arvind Batra mittels eines *Cytometric Bead Array (CBA) Multiplex Assays* bestimmt. Dabei wurde den Herstellerangaben entsprechend vorgegangen.

5.7 Isolation von Lymphozyten

5.7.1 OT-I T-Zellen aus Milz und Lymphknoten

Zur Isolation von OT-I T-Zellen aus Milz und Lymphknoten wurden die inguinalen, mesenterialen, axillaren, brachialen und lumbalen Lymphknoten und die Milz entnommen und mit Hilfe eines Spritzenkolbens unter Zugabe von ca. 30ml PBS/BSA durch einem Zellsieb (70 μ m) in ein 50ml Röhrchen gedrückt. Die Zellsuspension wurde für 5 Minuten bei 460xg, 4°C zentrifugiert, das Zellpellet für 5 Minuten auf Eis mit 5ml Erythrozyten-Lyse-Puffer inkubiert und zum Ausgleichen des hypotonen Erythrozyten-Lyse-Puffers mit ca. 20ml MACS-Puffer aufgefüllt. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei 460xg, 4°C wurde das Zellpellet in ca. 25ml MACS-Puffer aufgenommen, durch ein Zellsieb (70 μ m) filtriert und die Zellzahl bestimmt.

5.7.2 Lymphknoten und Milz

Zum Abschluss eines Experiments wurden Lymphozyten aus der Milz wie unter 5.7.1 beschrieben gewonnen. Abweichend wurde zur Isolation von Lymphozyten aus inguinalen oder mesenterialen Lymphknoten, die Lymphknoten unter Zugabe von 400 μ l PBS/BSA mechanisch zwischen zwei Objektträgern zerrieben und die Einzelzellsuspension in Reaktionsgefäßen (2ml) gesammelt. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 960xg, 4°C zentrifugiert, das Zellpellet in 1ml PBS/BSA resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

5.7.3 Intrahepatische Lymphozyten

Vor der Entnahme wurde die Leber über die *Vena portae* mit 5-10ml PBS/BSA perfundiert und die Gallenblase entfernt. Mit Hilfe eines Spritzenkolbens wurde die Leber unter Zugabe von ca. 25ml PBS/BSA durch ein Zellsieb (70 μ m) in ein 50ml Röhrchen gedrückt und die Suspension mit einem Vortex-Mischer homogenisiert. Um die parenchymalen Zellen zu sedimentieren, wurde die Zellsuspension für 1 Minute bei 50xg, 20°C zentrifugiert, der Überstand in ein neues 50ml Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 460xg, 20°C zentrifugiert. Dieses Zellpellet enthielt die intrahepatischen Lymphozyten, welche durch Dichtegradienten-Zentrifugation von den parenchymalen

Zellen geringerer Dichte getrennt wurden. Dazu wurden die Zellen in 5ml 42% Percoll-Lösung (v/v in RPMI+) resuspendiert und ohne Bremse für 20 Minuten bei 850xg, 20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 10ml PBS/FCS resuspendiert und nach 5 minütiger Zentrifugation bei 460xg, 4°C für 5 Minuten auf Eis mit 2ml Erythrozyten-Lyse-Puffer inkubiert. Zum Ausgleichen des hypotonen Erythrozyten-Lyse-Puffers wurde mit ca. 10ml PBS/BSA aufgefüllt und 5 Minuten bei 460xg, 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde je nach Größe in 1-5ml PBS/BSA resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

5.7.4 Intraepithelial- und Lamina propria Lymphozyten

Intraepitheliale Lymphozyten (IEL) und Lamina propria Lymphozyten (LPL) wurden aus dem Dünndarm oder Kolon mittels eines enzymatischen Verdaus und anschließender Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Dazu wurden die entnommenen Därme mit einer Knopfschere longitudinal aufgeschnitten und mit PBS sorgfältig vom Darminhalt gesäubert. Anschließend wurden die in ca. 1-1,5cm lange Stücke geschnittenen Därme in je 15ml PBS/FCS/DTT in einem 50ml Röhrchen für 15 Minuten bei 110U/min, 37°C in einem Horizontalschüttler geschwenkt, mit einer Pinzette in ein neues 50ml Röhrchen mit 15ml PBS/EDTA überführt und zweimal für etwa 15 Sekunden kräftig aus dem Handgelenk geschüttelt. Der Überstand wurde über ein 70µm Zellsieb filtriert für 5 Minuten bei 460xg, 20°C zentrifugiert, das IEL enthaltende Zell-Pellet in PBS/FCS gewaschen und erneut für 5 Minuten bei 460xg, 20°C zentrifugiert.

Zur Isolation der LPL-Fraktion wurden die ausgeschüttelten Darmstücke auf ca. 5mm Länge halbiert und in 10/15ml Verdaumedium (Kolon/Dünndarm) für 15/20 Minuten bei 110U/min, 37°C in einem Horizontalschüttler geschwenkt. Der Überstand wurde über ein 70µm Zellsieb filtriert, für 5 Minuten bei 460xg, 20°C zentrifugiert und in PBS/FCS gewaschen. Die Darmstücke wurden eine zweites Mal in 10/15ml Verdaumedium (Kolon/Dünndarm) für 15/20 Minuten bei 110U/min, 37°C in einem Horizontalschüttler verdaut, die Zellsuspension über ein 70µm Zellsieb filtriert und in PBS/FCS gewaschen. Die IEL- und LPL-Fraktionen wurden in 3ml 42% Percoll-Lösung (v/v in RPMI+) resuspendiert und in einem 15ml Schraubröhrchen auf 2ml

70% Percoll-Lösung (v/v in PBS/FCS) überschichtet. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei 850xg, 20°C ohne Bremse wurden die IEL/LPL aus der Interphase abgenommen, mit MACS-Puffer gewaschen und durchflusszytometrisch analysiert.

5.8 Zellzahlbestimmung

Um die Lebendzellzahl abzuschätzen, wurde von der Zellsuspension eine Probe von 10µl genommen und mit 90µl 0,4% Trypanblaulösung (v/v in PBS) sorgfältig vermischt (Verdünnungsfaktor 10). Von dieser Verdünnung wurden 10µl in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die ungefärbten lebenden Zellen in vier Großquadranten gezählt. Die Ausgangszellzahl wurde nach der Gleichung $\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\sum \text{Zellen}_{\text{gezählt}}}{4} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 10^4$ (Gleichung 1) berechnet.

5.9 MACS

Mittels *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS) lassen sich Zellen anhand von Oberflächenmolekülen aus einem Zellgemisch trennen. Dabei binden an superparamagnetische Partikel (*MicroBeads*) gekoppelte Antikörper an die Zellen, die das spezifische Oberflächenmolekül aufweisen. Bei der Passage einer mit ferromagnetischer Matrix gefüllten Säule werden die mit *MicroBeads* markierten Zellen im magnetischen Feld zurückgehalten, während unmarkierte Zellen die Säule passieren. Nach Entnahme der Säule aus dem Magnetfeld können die markierten Zellen von der Säule eluiert werden. So können mit dieser Methode Zellen aufgrund ihrer Oberflächenmoleküle positiv oder negativ aus einem Zellgemisch selektiert werden.

Die Isolation von CD8α⁺ T-Zellen erfolgte über eine Negativ-Selektion mit dem *CD8α⁺ T Cell Isolation Kit II* durch Depletion der CD8α⁻ Zellpopulationen nach Anleitung des Herstellers. Wie unter 5.7.1 beschrieben, wurde aus Milz und Lymphknoten eine Einzelzellsuspension hergestellt und in 400µl pro 1·10⁸ Zellen MACS-Puffer aufgenommen. Pro 1·10⁸ Zellen wurden 100µl einer Mischung von biotinylierten Antikörpern (gegen CD4, CD11b, CD11c, CD19, CD45R (B220), CD49b (DX5), CD105, MHC-II und Ter-119) zugegeben und für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Dann wurden pro 1·10⁸ Zellen 300µl MACS-Puffer und 200µl anti-Biotin-*Microbeads* hinzugefügt und erneut für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Suspension

wurde mit 10ml MACS-Puffer aufgefüllt, 10 Minuten bei 300xg, 4°C zentrifugiert und in 500µl MACS-Puffer pro $1 \cdot 10^8$ Zellen resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde über ein 30µm Zellsieb auf eine zuvor mit 3ml MACS-Puffer equilibrierte LS-Säule aufgetragen, 3 x 3ml MACS-Puffer über die Säule gegeben und der Durchfluss in einem 15ml Röhrchen auf Eis aufgefangen. Die im Durchfluss befindlichen CD8α⁺ Zellen wurden für 5 Minuten bei 460xg, 4°C zentrifugiert, zweimal in PBS gewaschen und die Zellzahl ermittelt. Die Reinheit wurde durchflusszytometrisch anhand der Oberflächenmoleküle CD8α, CD3ε, TCR Va2 und CD90.1 bestimmt und betrug im Mittel >95% CD3ε⁺ CD8α⁺ T-Zellen.

5.10 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe eines Durchflusszytometers (*Fluorescence Activated Cell Sorting*, FACS) lassen sich einzelne Zellen und Zellpopulationen in einem Zellgemisch aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften, wie Größe und Granularität sowie durch eine Markierung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen mit unterschiedlichen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern phänotypisch charakterisieren. In dem mit drei Lasern (405nm, 488nm, 633nm) ausgestatteten FACSCanto II war die gleichzeitige Messung von Vorwärtstreulicht (Größe), Seitwärtstreulicht (Granularität) und 8 Fluoreszenzparametern möglich.

5.10.1 Oberflächenfärbung

Für die Antikörper-Markierung wurden ca. $1 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^7$ Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt, für 5 Minuten bei 460xg, 4°C zentrifugiert und in 100µl-200µl FACS-Puffer resuspendiert. In diesem FACS-Puffer waren zur Blockierung unspezifischer Fc-Rezeptor-vermittelter Antikörperbindungen 1µg αCD16/32 sowie die für die jeweilige Färbung titrierte Menge der Fluorochrom-gekoppelten Antikörper (Verdünnung 1:100-1:1000) enthalten. Nach einer Inkubation für 15 Minuten bei 4°C wurden die Zellen für 5 Minuten bei 460xg, 4°C zentrifugiert und wenn ein biotinylierter Primäantikörper verwendet wurde, ein zweiter Inkubationsschritt für 15 Minuten bei 4°C mit einem Streptavidin-gekoppelten Fluorochrom (Verdünnung 1:200) angeschlossen. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 460xg, 4°C zentrifugiert

und entweder in 200-400µl Fixierungspuffer aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert oder eine intrazelluläre Färbung durchgeführt.

5.10.2 Intrazelluläre Färbung

Für eine intrazelluläre Färbung wurden die Zellen zunächst in 500µl 1% PFA (w/v in PBS) für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln fixiert, 5 Minuten bei 460xg, 4°C zentrifugiert, mit 200µl 0,5% Saponin (w/v in PBS) permeabilisiert und 5 Minuten bei 530xg, 4°C zentrifugiert. In 100µl 0,5% Saponin (w/v in PBS) wurden dann die Fluorochrom-gekoppelten Antikörper (Verdünnung 1:200) für 15 Minuten bei 4°C inkubiert, die Zellen bei 530xg, 4°C zentrifugiert und in 200-400µl Fixierungspuffer aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert.

5.11 In vitro Aktivierung von CD8 T-Zellen

Wie unter Abschnitt 5.9 beschrieben, wurden naive CD8 OT-I T-Zellen isoliert und ca. $10\text{-}15 \cdot 10^6$ Zellen pro Loch in 5ml RPMI+ mit 2µg/ml αCD28 in 6-Loch-Platten für 24h *in vitro* stimuliert. Die Löcher der Platten wurden zuvor mit 5mg/ml αCD3 in 1,5ml PBS, 2h, 37° beschichtet und 2x mit 5ml PBS gewaschen. Nach 24h Inkubation im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ wurden die Zellen abgenommen, die Löcher mit 5ml RPMI+ gewaschen und die Zellen nach einer Zentrifugation für 5 Minuten bei 460xg, 4°C zweimal mit 10ml PBS gewaschen. Die Zellzahl wurde bestimmt, ca. $5 \cdot 10^6$ Zellen *i.v.* in ASBT-OVA Mäuse transferiert und der Phänotyp hinsichtlich der Marker CD62L und CD44 sowie Integrin α4β7 und β1 und CCR9 durchflusszytometrisch analysiert.

5.12 Proliferations-Assay

Um die Proliferation der OT-I T-Zellen verfolgen zu können, wurden die Zellen mit dem membrangängigen, nicht fluoreszierenden Farbstoff 5-,6-Carboxyfluoresceindiazetat-succinimidylester (CFDA-SE) inkubiert. Dieser wird intrazellulär durch Esterasen zum fluoreszierenden Farbstoff Carboxyfluorescein-succinimidylester (CFSE) umgesetzt, reagiert mit Aminogruppen von Proteinen und wird so kovalent im Zytosol gebunden. Bei einer Zellteilung wird der Farbstoff mit dem Zytosol gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. Die damit verbundene Verringerung des Farbstoffgehalts

pro Zelle geht mit einer entsprechenden Verringerung der Fluoreszenzintensität einher und kann durchflusszytometrisch bestimmt werden.

Wie unter 5.7.1 beschrieben, wurden OT-I T-Zellen isoliert, in $1\text{ml}/10^7$ Zellen RPMI mit $5\mu\text{M}$ CFDA-SE resuspendiert, für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 10% des Gesamtvolumens FCS gestoppt. Die Zellen wurden 5 Minuten bei $460\times g$, 4°C zentrifugiert, in PBS resuspendiert, über ein $30\mu\text{m}$ Zellsieb filtriert und die Zellzahl bestimmt. Für den adoptiven Transfer wurden die Mäuse mit Ketamin/Xylazin ($100\text{mg}/10\text{mg}$ pro kg) narkotisiert und ca. $4\cdot 10^6$ CFSE markierte OT-I T-Zellen in $200\mu\text{l}$ PBS *i.v.* injiziert.

5.13 Restimulation in vitro

Um die Kapazität zur Produktion von Effektor-Zytokinen zu bestimmen, wurden Lymphozyten aus Milz, mesenterialen Lymphknoten, Leber und Darm isoliert (siehe 5.7.2 ff) und über den T-Zell-Rezeptor mit OVA₂₅₇₋₂₆₄ oder mit PMA/Ionomycin, welche direkt die Protein Kinase C und Calcium-abhängige Signalwege aktivieren, *in vitro* stimuliert. Mittels Brefeldin A wurde der Protein-Transport vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat inhibiert, wodurch translatierte Proteine in der Zelle akkumulieren und die von der Zelle gebildeten Zytokine durch fluoreszenzmarkierte Antikörper nachgewiesen werden können.

Etwa $1\cdot 10^6$ Zellen wurden in $100\mu\text{l}$ in sterilen FACS-Röhrchen in RPMI+ verteilt, jeweils $75\mu\text{l}$ mit $10\mu\text{M}_{\text{final}}$ OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) Peptid oder $75\mu\text{l}$ mit $20\text{nM}_{\text{final}}$ Phorbol-12-Myristat-13-acetat/ $1\mu\text{M}_{\text{final}}$ Ionomycin in RPMI+ hinzugefügt und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach 1h wurde jeweils in $25\mu\text{l}$ RPMI+ $5\mu\text{g}/\text{ml}$ Brefeldin A (zur Detektion von IFN- γ , IL-2) oder GolgiStop (Monensin+Brefeldin A) (zur Detektion von TNF- α , IL-10) hinzugefügt und für weitere 4-5h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Dann wurden die Zellen für 5 Minuten bei $460\times g$, 4°C zentrifugiert, einmal mit 1ml FACS-Puffer gewaschen und wie unter 5.10.1f beschrieben gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

5.14 *In vivo* Zytolyse-Assay

Die zytolytische Kapazität von OT-I CD8 T-Zellen in den Empfängertieren wurde *in vivo* bestimmt, indem OVA₂₅₇₋₂₆₄ beladene fluoreszenzmarkierte Milzzellen zusammen mit unbeladenen Kontroll-Milzzellen transferiert wurden, und die spezifische Lyse der beladenen Zellen im Verhältnis zu den Kontroll-Milzzellen durchflusszytometrisch erfasst wurde.

Dazu wurden aus B6-Wildtyp Mäusen Milzzellen isoliert (siehe 5.7.2) und je ein Teil der Zellen mit 7,5µM CFDA-SE (CFSE^{high}) bzw. 0,75µM CFDA-SE (CFSE^{low}), wie in 5.12 beschrieben, markiert. Die CFSE^{high} markierten Zellen wurden dann in einem Zellkultur-Flachröhrchen in RPMI+ mit 1µM OVA₂₅₇₋₂₆₄ beladen, der CFSE^{low} markierte Teil wurde in RPMI+ ohne Peptid für 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden direkt in den Zellkultur-Flachröhrchen für 5 Minuten bei 460xg, 4°C zentrifugiert und zweimal mit 15ml PBS gewaschen. Um verklumpte tote Zellen abzutrennen, wurden die Zellen über ein 30µm Zellsieb filtriert, die Zellzahlen bestimmt und OVA₂₅₇₋₂₆₄ beladene, CFSE^{high} markierte Zellen mit unbeladenen, CFSE^{low} markierten Zellen zu gleichen Teilen gemischt.

Die Empfängertiere und eine unbehandelte B6-Wildtyp Maus als Referenz wurden mit Ketamin/Xylazin (100mg/10mg pro kg Körpergewicht *i.p.*) narkotisiert und ca. 8·10⁶ des CFSE-markierten Milzzellgemisches *i.v.* injiziert. Nach 5h wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet, die Lymphozyten aus Milz, mesenterialen Lymphknoten und Leber, wie unter 5.7.2 beschrieben, isoliert und durchflusszytometrisch analysiert.

In den Empfängertieren etwaig zytolytisch aktive OT-I CD8 T-Zellen können die transferierten OVA₂₅₇₋₂₆₄ beladenen Milzzellen (CFSE^{high}) Antigen-spezifisch lysieren, während die nicht Peptid-beladenen Milzzellen intakt bleiben. So nimmt der Anteil CFSE^{high} markierter Zellen im Verhältnis zu CFSE^{low} markierten Zellen ab. Dieses Verhältnis wird zur spontanen bzw. unspezifischen Lyserate in der B6-Wildtyp Maus in Relation gesetzt. Die spezifische Lyserate wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$100 \cdot \left(1 - \frac{CFSE_{Referenz}^{low} / CFSE_{Referenz}^{high}}{CFSE_{Versuch}^{low} / CFSE_{Versuch}^{high}} \right) \text{ (Gleichung 2).}$$

5.15 RNA-Isolation und reverse Transkription

5.15.1 RNA-Isolation

Die für die RNA-Isolation verwendete TRIzol-Lösung enthält Phenol und Guanidin-Isothiocyanat und erlaubt die Gewinnung reiner, undegradierter Gesamt-RNA aus Geweben und Einzelzellen mit hoher Ausbeute (Chomczynski und Sacchi, 1987). Dabei werden Reinheit und Integrität der gewonnenen RNA maßgeblich vom Verhältnis der eingesetzten Zellmenge zur TRIzol-Lösung bestimmt. Die RNA-Isolation wurde den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

Die Gewebeproben wurden von -80°C in 1ml eisgekühlte TRIzol-Lösung überführt, mechanisch mit der Lysematrix im Fastprep-Gerät 2×20 Sekunden homogenisiert und dazwischen ca. 1 Minute auf Eis gekühlt, um die entstandene Reibungswärme der Keramikpartikel abzuführen. Nach Zentrifugation für 15 Minuten bei $20800 \times g$, 4°C wurde der Überstand in einem neuen 1,5ml Reaktionsgefäß mit $200\mu\text{l}$ Chloroform versetzt und mit dem Vortex-Mischer für ca. 15 Sekunden kräftig geschüttelt. Die entstandene Emulsion wurde für 2-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und zur Phasentrennung für 15 Minuten bei $12000 \times g$, 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde die obere, farblose, wässrige Phase sorgfältig in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt, die darin enthaltene RNA zur Fällung mit $500\mu\text{l}$ Isopropanol für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei $12000 \times g$, 4°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 1ml 75% Ethanol gewaschen, um koprizipitierte Salze zu entfernen. Das Pellet wurde schließlich für ca. 5-15 Minuten bei 37°C getrocknet und in $20\mu\text{l}$ nukleasefreiem Wasser resuspendiert.

Die RNA aus isolierten sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) wurde analog gewonnen. Dazu wurden ca. $1 \cdot 10^6$ Zellen mit 1ml TRIzol versetzt und für ca. 30s auf dem Vortex-Mischer homogenisiert. Das weitere Vorgehen ist dem oben beschriebenen zu entnehmen.

Die isolierte RNA wurde zusätzlich einem DNase-Verdau unterworfen, um etwaige Kontaminationen mit genomischer DNA zu eliminieren. Dazu wurden ca. $10\mu\text{g}$ RNA im mitgelieferten DNase-Reaktionspuffer mit 1,5U DNase I und 20U RNaseOUT in einem Gesamtvolumen von ca. $20\mu\text{l}$ für 15 Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert, die Reaktion mit 2,5µl EDTA (25mM, pH 8,0) gestoppt und das Enzym bei 65°C für 10 Minuten inaktiviert. Durch den Zusatz von RNaseOUT wurde eine deutliche Verbesserung der RNA-Integrität erreicht, da die Wirkung von RNasen während des DNase-Verdau bei Raumtemperatur spezifisch inhibiert wird. Abschließend wurde die RNA aus dem Reaktionsgemisch von entstandenen Oligodesoxyribonukleotiden mittels Ethanolfällung getrennt. Diese interferieren mit der nachfolgenden photometrischen Quantifizierung und können die reverse Transkription oder die PCR stören. Zur Unterstützung der Präzipitation wurde Pellet Paint als Carrier eingesetzt. Im Detail wurde jeder Reaktionsansatz mit 2,2µl 3M Natriumacetat, 1,5µl Pellet Paint und 75µl Ethanol versetzt, kurz gevortext und für mindestens 30 Minuten bei -20°C inkubiert. Im Anschluss wurde für 15 Minuten bei 16000xg, 4°C zentrifugiert, das Pellet mit 75% Ethanol gewaschen und bei 37°C für ca. 10-15 Minuten sorgfältig getrocknet und in 15µl nukleasefreiem Wasser resuspendiert.

5.15.2 RNA-Quantifizierung

Die RNA-Konzentration und die Reinheit wurden photometrisch in 1,5µl mittels Nanodrop bestimmt. Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260nm, während Proteine mit aromatischen Aminosäuren kurzwelliges Licht der Wellenlänge 280nm absorbieren. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz kann die Konzentration der Nukleinsäuren berechnet werden und das Verhältnis $\text{Absorption}_{260\text{nm}}/\text{Absorption}_{280\text{nm}} > 1,9$ dient als Maß für die Reinheit. Bis zur weiteren Verwendung wurden die RNA-Proben bei -80°C aufbewahrt.

5.15.3 Reverse Transkription

Um die Transkriptmenge mittels *Realtime* PCR quantifizieren zu können, ist es nötig, die mRNA in cDNA umzuschreiben. Dies geschieht mit RNA-abhängigen DNA-Polymerasen viralen Ursprungs, welche für die reverse Transkription *in vitro* optimiert wurden. Hier wurde das Enzym Superscript III von Invitrogen verwendet, das sich durch eine reduzierte RNase H Endonukleaseaktivität und einer hohen Prozessivität auszeichnet und eine hohe Ausbeute von *full-length* Transkripten verspricht.

Es wurden ca. 2µg RNA mit 100ng *Random Hexamer Primern* und 1µl dNTPs (je 10µM) in einem Gesamtvolumen von 12µl für 5 Minuten bei 65°C inkubiert und sofort auf Eis heruntergekühlt. Dazu wurden 4µl First Strand Buffer (5x), 2µl DTT (0,1M) und 1µl RNaseOUT (40U/µl) gegeben und für 10 Minuten bei 25°C, dann 2 Minuten bei 42°C inkubiert. Schließlich wurde die Reaktion mit 1µl Superscript III (200U/µl) gestartet und nach 50 Minuten bei 42°C das Enzym 15 Minuten bei 70°C inaktiviert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die cDNA-Proben bei -20°C aufbewahrt.

5.16 *Realtime* RT-PCR

5.16.1 *Primer-Design*

Um eine Amplifikation von genomischer DNA zu vermeiden, wurden die *Primer* für die *Realtime* RT-PCR so gewählt, dass sie zwei Exons überstreichen. So bindet nur die aus einem gespleißten Transkript hervorgegangene cDNA den *Primer* vollständig und wird amplifiziert, während bei genomischer DNA das 3' Ende des *Primers* nicht mit der Intronsequenz komplementär ist und daher kein geeignetes Substrat für die DNA-Polymerase darstellt. Weitere Kriterien waren eine ähnliche *Annealing*-Temperatur um 60°C, geringe intra- und intermolekulare Komplementarität der Vorwärts-/Rückwärts-Primer mit niedrigem G/C-Gehalt am 3' Ende und eine möglichst kurze Länge des erzeugten Amplifikates unter 180bp. Diese gestatten die parallele Amplifizierung mehrerer Gene in einem PCR-Lauf, dienen der Unterdrückung der Bildung von Primerdimeren und ermöglichen eine gleichmäßig hohe PCR-Effizienz (Bustin, 2000). Dazu kam die Software Primer Express 2.0 (Applied Biosystems) zum Einsatz.

5.16.2 *Realtime* RT-PCR

Alle *Realtime* PCR Verfahren beruhen auf der Messung von Fluoreszenzsignalen, welche sich proportional zur DNA-Menge entwickeln, so dass während des PCR-Laufes der Fortschritt der Reaktion verfolgt werden kann. Neben interkalierenden Farbstoffen kommen dazu fluoreszenzmarkierte Sonden zum Einsatz, die spezifisch an eine Zielsequenz binden. Die hier verwendete einfache und kostengünstige Methode

mit dem interkalierenden Farbstoff *Eva-Green* birgt dabei den Nachteil, dass unspezifische und spezifische Produkte in gleichem Maße detektiert werden und die PCR-Bedingungen daher sorgfältig optimiert werden müssen. Aufgrund ihrer Sequenz besitzen die jeweiligen Amplifikate jedoch unterschiedliche Schmelztemperaturen, die im Anschluss an den PCR-Lauf automatisch bestimmt werden. Durch Vergleich mit den theoretisch erwarteten lassen sich so Rückschlüsse auf die Spezifität der PCR-Reaktion ziehen und zufällige Produkte anhand ihrer niedrigeren, uneinheitlichen Schmelztemperaturen von der Auswertung ausschließen.

Für ein Gesamtvolumen von 30µl pro Ansatz wurde ein Mastermix mit 12,5µl 2x *SsoFast Eva-Green* Reaktionsgemisch und je 1µl Vorwärts-/Rückwärtsprimer (100nM) hergestellt. Davon wurden in einer 96-well Platte mit speziellen optischen Eigenschaften je 20µl verteilt und mit einer Mehrkanalpipette 5µl der cDNA-Proben in zwei seriellen Verdünnungsstufen (1:50, 1:200) zugegeben. Die Verdünnungen und das Auftragen der Proben auf die PCR-Platte müssen dabei mit größter Sorgfalt ausgeführt werden, weil kleinste Variationen aufgrund des exponentiellen Charakters der PCR zu großen Abweichungen führen. Daher wurde für die cDNA-Proben ein Volumen von 5µl gewählt, um den relativen Fehler beim Pipettieren zu minimieren.

Die *Realtime* RT-PCR wurde mit dem vom Hersteller vorgeschlagenen Temperaturprofil durchgeführt. Dem initialen Denaturierungsschritt von 10 Minuten bei 95°C folgten 45 Zyklen mit 15s bei 95°C und 60s bei 60°C. Die Zusammenfassung von *Annealing* und Primerverlängerung in einem Schritt bei 60°C verringert zwar die Enzymaktivität der DNA-Polymerase, jedoch wird die Signalstärke der nach jedem Zyklus aufgezeichneten Fluoreszenz erhöht, da die Anzahl der pro DNA-Doppelstrang interkalierten Farbstoffmoleküle temperaturabhängig ist.

5.16.3 Datenanalyse

Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurde eine Schmelzkurvenanalyse ausgeführt. Während einer stetigen Temperaturerhöhung wird dabei das Auseinanderweichen der DNA-Doppelstränge und die damit verbundene Fluoreszenzabnahme verfolgt, und durch Differentiation erhält man bei der maximalen Änderungsgeschwindigkeit einen *Peak*, der die Schmelztemperatur wiedergibt.

Die *Realtime* PCR ermöglicht es den Verlauf der DNA-Zunahme während der Reaktion zu verfolgen. Da in der exponentiellen Phase das detektierte Produkt direkt von der Menge des Ausgangsmaterials abhängt, wird das Erreichen einer bestimmten Signalstärke als Maß für die Quantifizierung herangezogen. Der entsprechende Zyklus wird als *Threshold Cycle* (C_t) bezeichnet, er ist der Schnittpunkt der Amplifikationskurve mit der gewählten Schwelle. Die Reaktion folgt zu Beginn näherungsweise einer Kinetik erster Ordnung: $X_n = X_0 \cdot (1+E)^n$ (Gleichung 3), wobei X_0 die Zahl der Ausgangsmoleküle, X_n die Menge des Amplifikates nach n Zyklen und E die PCR-Effizienz beschreiben. Bei einer ideal ablaufenden Reaktion verdoppelt sich während der PCR nach jedem Zyklus die durch die *Primer* bestimmte DNA-Sequenz und die PCR-Effizienz hat den Wert 1. Dabei nimmt das gemessene Fluoreszenzsignal entsprechend zu und obige Gleichung geht über in: $R_{C_t} = R_0 \cdot (1+E)^{C_t}$ (Gl. 4) mit der zum Ausgangsprodukt proportionalen Reporter-Fluoreszenz R_0 und der Fluoreszenz R_{C_t} beim *Threshold Cycle* C_t . Je eher dabei der Schwellenwert erreicht wird (kleiner C_t -Wert), desto mehr Ausgangsmaterial war in der ursprünglichen Probe vorhanden. Im späteren Verlauf sinkt die Effizienz der Reaktion durch Verbrauch der Reagenzien, Produktinhibition, Enzyminstabilität und Konkurrenz der Amplifikate mit den Primern im *Annealing*-Schritt ab und das Signal erreicht ein Plateau mit $E \ll 1$.

Für den Vergleich zweier Proben wird häufig die relative Quantifizierung bezüglich eines stabil exprimierten Referenzgens verwendet, hier wurde das ribosomale Protein L4 (RPL4) anhand von in der Arbeitsgruppe vorhandenen *Genechip-Assay* Daten als unreguliertes, mittelstark exprimiertes Transkript ausgewählt (Eickmeier *et al.*, 2014).

5.17 Histologie

5.17.1 Gewebeschnitte

Für Gewebeschnitte wurden Proben von Leber (mit 5-10ml PBS perfundiert, *Lobus hepatis dexter lateralis*), Dünndarm (medial 1cm lang) oder Kolon (ca. 1cm *Kolon deszendenz*) entnommen, in 4% PFA bei 4°C für 24h fixiert und bis zur Einbettung in 70% Ethanol bei 4°C gelagert. Die Proben wurden in einem

Einbettautomaten entwässert und in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke wurden bei -20°C gelagert, bevor an einem Mikrotom $4\mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt wurden. Die Schnitte wurden mit Dako Kapillar-Objekträgern aufgenommen, ca. 2h bei 37°C getrocknet und bis zur Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

Für Gefrierschnitte wurden, wie oben beschrieben, Proben von Leber, Dünndarm oder Kolon entnommen, direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. In einem Kryostat wurden die Proben mit Tissue-Tek auf Aluminiumzylindern bei -25°C fixiert und ca. $6\text{--}8\mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mit SuperFrost Objekträgern aufgenommen, für ca. 2h bei Raumtemperatur getrocknet und bei -80°C gelagert.

5.17.2 Entparaffinierung

Vor den Färbungen wurden die Paraffinschnitte in Roti-Histol (Xylolersatz) für 2×10 Minuten entparaffiniert und durch sequenzielle Inkubation für jeweils 5 Minuten über eine absteigende Alkoholreihe (Isopropanol, 90% Ethanol, 80% Ethanol, 70% Ethanol, 50% Ethanol, $2 \times \text{ddH}_2\text{O}$) rehydriert.

5.17.3 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Zur morphologischen Beurteilung wurde von $4\mu\text{m}$ Gewebeschnitten eine Hämatoxylin-Eosin (H/E)-Färbung angefertigt. Dabei werden Zellkerne durch Hämatoxylin blau-violett und das Zytoplasma durch Eosin rötlich angefärbt. Die entparaffinierten Schnitte wurden dazu für 8 Minuten in Hämalaulösung inkubiert, unter fließendem Leitungswasser für 3 Minuten gewaschen und dann für 10 sec mit Eosinlösung (1% in ddH_2O) gefärbt. Das überschüssige Eosin wurde unter fließendem Leitungswasser für ca. 10 Minuten ausgewaschen, die Schnitte mit 37°C warmer Kaisers Glyceringelatine eingebettet und bei 4°C gelagert.

5.17.4 Immunhistochemie

Nach der Entparaffinierung wurden die Schnitte in Citrat-Puffer (pH 6,0) für 2 Minuten im Schnellkopftopf erhitzt, mit kaltem Wasser abgekühlt und mit Tris-Puffer (pH 7,4) gewaschen. Um unspezifische Färbungen zu verringern, wurden die Schnitte für 10 Minuten mit Peroxidase-Blockierungslösung (3% Wasserstoffperoxid gegen

endogene Peroxidasen) oder Biotinblockierungsreagenz (sättigt endogene Biotin/Streptavidin-Bindungsstellen) behandelt.

Zur Detektion von **CD3** oder Myeloperoxidase (**MPO**) wurden die Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit anti-CD3 (1:300) oder anti-MPO7 (1:500) inkubiert, mit Tris-Puffer (pH 7,4) gewaschen und je 30 Minuten mit biotinyliertem Esel anti-Kaninchen Sekundärantikörper (1:200) und mit dem Streptavidin-Alkalische Phosphatase *Kit* inkubiert mit *Fast Red* als Chromogen für 20min.

Zur Detektion von **CK19** wurden die Schnitte abweichend zur normalen Prozedur für 5 Minuten in Citrat-Puffer (pH 6,0) im Schnellkopftopf erhitzt, sonst wurde wie oben beschrieben verfahren. Die Schnitte wurden mit anti-CK19 (1:400) für 60 Minuten inkubiert und nach dem Waschen mit Tris-Puffer für 1h mit dem *EnVision Peroxidase Rabbit Kit* mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) als Chromogen für 5 Minuten gefärbt.

Zur Detektion von **F4/80** wurden deparaffinierte Schnitte zur Demaskierung des Antigens mit Proteinase K für 20 Minuten bei 37°C behandelt, mit Tris-Puffer gewaschen und mit anti-F4/80 (1:100) für 30 Minuten inkubiert. Nach dem Waschen mit Tris-Puffer wurden die Schnitte mit einem biotinylierten Kaninchen anti-Ratte Sekundärantikörper (1:1000) für 30 Minuten inkubiert, gefolgt von 30 Minuten Streptavidin-Alkalische-Phosphatase und 20 Minuten *Fast Red* als Chromogen.

Zur Detektion von **B220** wurden deparaffinierte Schnitte ohne weitere Vorbehandlung mit anti-B220 (1:200) für 30 Minuten inkubiert, mit Tris-Puffer gewaschen und mit biotinylierten Kaninchen anti-Ratte Sekundärantikörper (1:1000) für 30 Minuten inkubiert, gefolgt von 30 Minuten Streptavidin-Alkalische-Phosphatase und 30 Minuten *Fast Red* als Chromogen.

Zur Detektion von **FoxP3** wurden deparaffinierte 2-3µm Schnitte in Citrat-Puffer (pH 6,0) erhitzt und nach dem Waschen mit anti-FoxP3 (1:100) inkubiert, gefolgt von biotinyliertem Kaninchen anti-Ratte Sekundärantikörper und dem *EnVision Peroxidase Kit* mit DAB als Chromogen.

Zur Detektion von **CD8** mussten Gefrierschnitte verwendet werden, da bisher kein auf PFA-fixierten Geweben funktionierender Antikörper erhältlich ist. Die

Gefrierschnitte wurden bei Raumtemperatur getrocknet, für 10 Minuten mit eiskaltem Aceton fixiert, mit Avidin/Biotinblockierungsreagenzien für je 10 Minuten behandelt und mit anti-CD8 (1:100) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen mit Tris-Puffer wurden die Schnitte mit einem biotinylierten anti-Ratte Sekundärantikörper inkubiert und mit dem *Streptavidin-Alkalische Phosphatase Kit* mit *Fast Red* als Chromogen angefärbt und mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Zur Detektion von **CD90.1** wurden 5µm Gefrierschnitte mit Avidin/Biotinblockierungsreagenzien für je 10 Minuten behandelt, mit biotinyliertem anti-CD90.1 (1:100) über Nacht bei 4°C inkubiert und nach dem Waschen mit Tris-Puffer mit dem *Streptavidin-Alkalische Phosphatase Kit* für 30 Minuten inkubiert. Die Schnitte wurden mit *Fast Red* als Chromogen 8 Minuten angefärbt und mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Für die Co-Färbung mit **CK19** wurden Gefrierschnitte wie beschrieben für **CD90.1** gefärbt, mit Formalin (4% v/v Wasser) für 1h fixiert, mittels aufsteigender Alkoholreihe dehydriert und an der Luft getrocknet. Dann wurden die Schnitte wie oben beschreiben für CK19 gefärbt.

Die immunhistochemischen Färbungen wurden in Kooperation mit Simone Spieckermann und Anja Kühl durchgeführt.

5.17.5 Histopathologische Analyse

Die semiquantitative Auswertung von 10 Hauptgesichtsfeldern (0,237mm²) wurde ohne Kenntnis der Gruppenzuordnung von Anja Kühl durchgeführt, ebenso die histopathologische Beurteilung der Kolitis (Tabelle 2).

Tabelle 2: Histologische Beurteilung der Entzündung im Darm nach (Erben et al., 2014).

Score	Beschreibung
0	Keine Entzündung, keine Veränderungen
1	Einzelne, isolierte Zellinfiltrate innerhalb der Schleimhaut, keine Epithelhyperplasie
2	Mild gestreute Zellinfiltrate innerhalb der Mukosa und Submukosa, milde diffuse Epithelhyperplasie, beginnender Verlust von Becherzellen
3	Zellinfiltrate in der Schleimhaut, Submukosa und teilweise transmural; Epithelhyperplasie; Verlust von Becherzellen
4	Zellinfiltrate innerhalb der Schleimhaut, Submucosa und transmurale, schwere Entzündung; Verlust von Zellen, Verlust der Krypten; Ulzeration, schwere Epithelhyperplasie

5.18 Statistik

Die Ergebnisse sind als Mittelwert + Standardabweichung oder als Box-Plot, bei dem die Box die oberen/unteren Quartile, eine horizontale Linie den Median und die Antennen die Extrema kennzeichnen, dargestellt. Wegen des meist geringen Stichprobenumfangs wurden die Daten mittels des nichtparametrischen Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test auf statistische Unterschiede untersucht. Mehrere Stichproben wurden mittels Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's post-hoc Test miteinander verglichen. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha < 0,05$ gewählt. Die Abbildungen und Berechnungen wurden mit Graphpad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) erstellt.

6. Anhang

6.1 Ergänzende Abbildungen und Tabellen

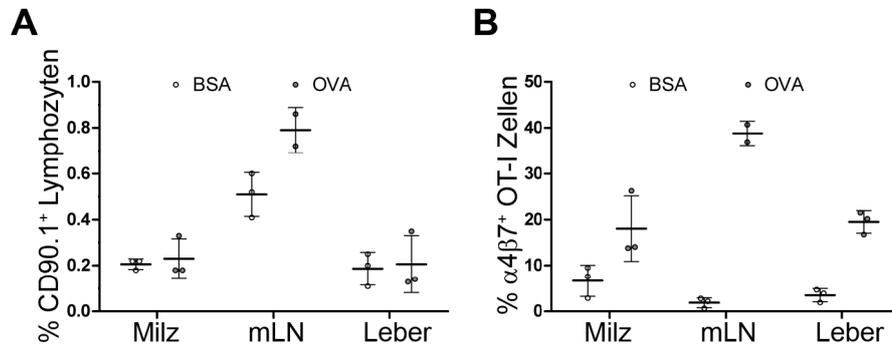


Abb. 21: Proliferation OVA-Kolitis: Zellzahl und Phänotyp.

Wildtyp-B6 Mäuse wurden rektal mit Ethanol, gefolgt von Ovalbumin (OVA) oder Rinderserumalbumin (BSA) behandelt und gleichzeitig wurden naive OT-I T-Zellen *i.v.* transferiert. (A) Der Anteil CD90.1⁺ OT-I Zellen bezogen auf Gesamtlymphozyten basierend auf dem Vorwärts-Seitwärts-Streulicht wurde durchflusszytometrisch am Tag 2 bestimmt (n=3). (B) Der Anteil Integrin $\alpha 4\beta 7$ positiver CD90.1⁺ OT-I Zellen wurde durchflusszytometrisch am Tag 2 bestimmt (n=3).

Tabelle 3: Phänotyp der OT-I T-Zellen vor und nach *in vitro* Aktivierung

	naiv		in vitro aktiviert	
	MW	SD	MW	SD
CD62L ⁻ CD44 ^{high}	7,9	4,1	53,4	22,2
Integrin $\alpha 4\beta 7$	0,06	0,06	0,16	0,27
Integrin $\beta 1$	6,4	5,2	55,0	19,7
CXCR3	17,0	3,6	65,8	28,5
CCR9	93,6	4,7	61,6	37,5

Naive OT-I T-Zellen wurden isoliert und für 24h *in vitro* mit plattengebundenen anti-CD3 ϵ und löslichem anti-CD28 Antikörpern stimuliert. Der Phänotyp der OT-I T-Zellen wurde vor und nach der Kultur hinsichtlich der Expression von CD62L, CD44, Integrin $\alpha 4\beta 7$, Integrin $\beta 1$ und der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR9 durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind der prozentuale Anteil der positiven Zellen als Mittelwert (MW) und die zugehörige Standardabweichung (SD), (n=3).

Tabelle 4: Phänotyp der CD8 OT-I T-Zellen in IFABP-OVA und in B6-Wildtyp Mäusen bei OVA-Kolitis

		OVA-Kolitis OVA		OVA-Kolitis BSA		IFABP-OVA		Statistischer Vergleich	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD	OVA vs. BSA	OVA vs. IFABP
CD62L⁻ CD44^{high}	Milz	35,2	9,5	11,7	5,6	68,9	10,8	***	***
	mLN	42,3	8,1	9,2	6,0	72,8	13,0	***	***
	Leber	50,2	4,3	12,3	3,7	73,3	10,0	***	***
	IEL	73,2	6,8	-	-	84,4	9,9	-	***
Integrin α4β7	Milz	22,0	7,0	5,9	1,9	53,7	9,9	***	***
	mLN	22,4	4,5	8,5	0,6	39,4	10,2	***	***
	Leber	18,6	3,7	6,2	0,6	45,0	10,4	**	***
	IEL	24,5	12,4	-	-	33,1	14,9	-	ns
Integrin β1	Milz	72,4	10,1	24,2	10,7	60,1	7,1	***	*
	mLN	60,6	8,8	14,8	5,9	39,6	15,0	***	***
	Leber	76,8	8,9	10,8	4,6	55,1	9,2	***	***
	IEL	60,5	13,2	-	-	44,9	19,0	-	*
CXCR3	Milz	74,1	11,0	26,9	11,7	78,6	9,2	***	ns
	mLN	74,7	9,1	23,4	4,8	73,1	31,4	***	ns
	Leber	68,7	11,9	29,5	10,0	83,6	11,2	***	ns
	IEL	79,6	17,5	-	-	79,0	24,9	-	ns
CCR9	Milz	46,2	18,8	67,3	18,0	71,9	11,0	*	**
	mLN	47,4	8,4	71,7	11,2	76,8	14,4	**	***
	Leber	16,4	7,1	63,5	18,7	56,0	12,9	***	***
	IEL	60,5	9,0	-	-	95,3	3,4	-	**
CCR5	Milz	11,5	7,0	8,1	4,2	19,1	12,1	ns	ns
	mLN	8,8	2,0	7,4	1,9	20,3	15,1	ns	ns
	Leber	3,8	0,8	3,8	1,4	15,8	7,2	ns	**
	IEL	42,0	33,7	-	-	81,9	14,5	-	ns
IFN-γ	Milz	51,8	11,6	12,7	7,4	52,7	14,0	***	ns
	mLN	41,1	10,2	14,7	11,4	45,8	16,9	***	ns
	Leber	48,3	8,0	9,9	5,2	49,6	9,9	ns	ns

Wildtyp-B6 Mäuse wurden rektal mit Ethanol, gefolgt von OVA oder BSA behandelt und gleichzeitig wurden naive OT-I T-Zellen *i.v.* transferiert, oder naive OT-I T-Zellen wurden *i.v.* in IFABP-OVA Mäuse transferiert. Lymphozyten wurden am Tag 4 aus Milz, mLN, Leber und IEL isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Der prozentuale Anteil der für das jeweilige Oberflächenmolekül positiven bzw. nach Restimulation mit OVA₂₅₇₋₂₆₄ IFN-γ positiven Zellen bezogen auf CD90.1⁺ OT-I T-Zellen ist als Mittelwert (MW) mit Standardabweichung (SD) dargestellt, zusammengefasst aus zwei Experimenten (n=6-8). Die Gruppen wurden mittels zweifachem ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test miteinander verglichen (*** p<0,001; ** p<0,01; * p<0,05; ns, nicht signifikant p>0,05, - nicht bestimmt).

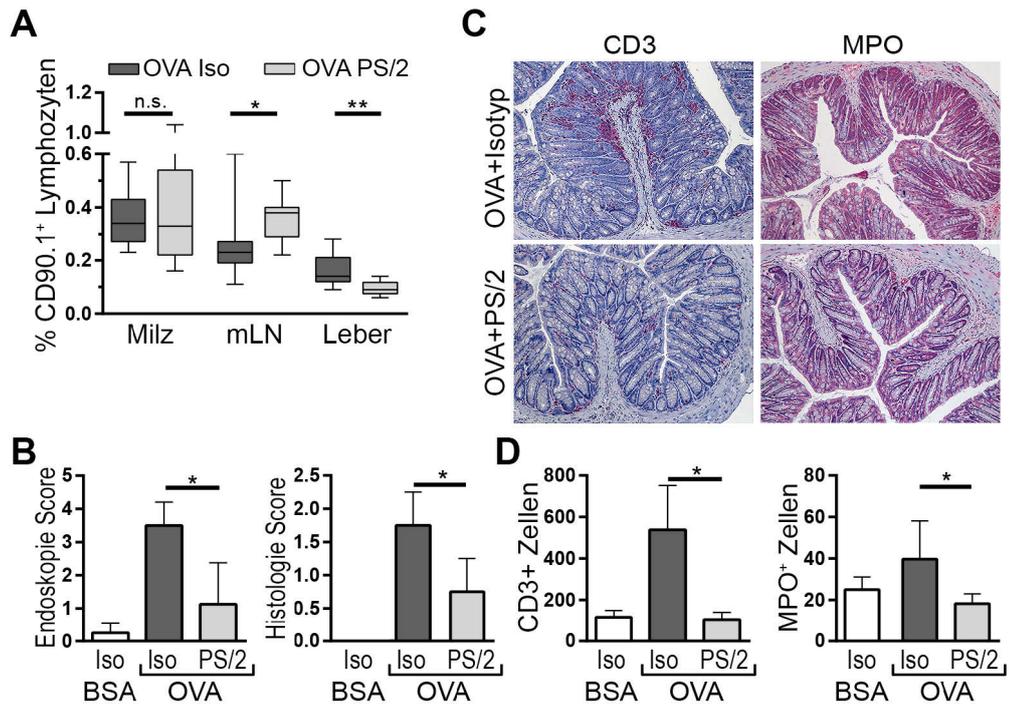


Abb. 22: OVA-Kolitis Behandlung durch anti-Integrin $\alpha 4$

Wildtyp-B6 Mäusen wurde einen Tag bevor und an den Tagen 1 / 3 nachdem eine OVA-Kolitis ausgelöst wurde ein anti-Integrin $\alpha 4$ Antikörper (PS/2) oder die gleiche Menge eines Isotyp-Antikörpers (Iso) *i.p.* appliziert. (A) Der Anteil CD90.1⁺ OT-I Zellen bezogen auf Gesamtlymphozyten (FSC/SSC) wurde durchflusszytometrisch am Tag 2 bestimmt (n=8). (B) Am Tag 4 wurde das Kolon endoskopisch untersucht und Veränderungen hinsichtlich Granularität, Vaskularisierung, Lichtdurchlässigkeit der Darmwand, Fibrinablagerungen und der Konsistenz des Kotes bewertet, der mittlere Gesamtscore sowie die Semi-quantitative Analyse der Histopathologie sind als Mittelwert + Standardabweichung dargestellt (n=4). (C) Repräsentative Bilder der Immunhistochemie für CD3 bzw. MPO von Kolonbiopsien, Vergrößerung 100x (n=4), (D) Summe der CD3⁺ Zellen pro 10 Hauptgesichtsfelder (HPF, entspricht 0,237mm²) und der MPO⁺ Zellen pro 10 HPF. Mittelwert + Standardabweichung (n = 4), Mann-Whitney-U-Test * p < 0,05

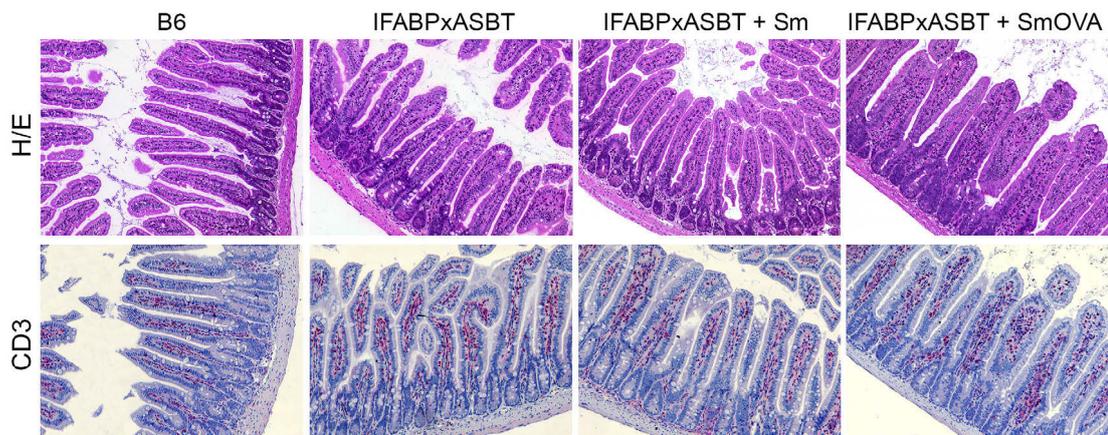


Abb. 23: Histologie des Dünndarms nach *Salmonella*-Infektion

IFABPxASBT-OVA Mäuse wurden mit *Salmonella* (*Sm*) oder *Salmonella*-OVA (*SmOVA*) oral infiziert und zwei Tage später naive OT-I T-Zellen *i.v.* transferiert. Repräsentative Bilder der H/E-Färbung und CD3 Immunhistochemie von medialen Dünndarmbiopsien von IFABPxASBT-OVA und naiven Wildtyp-B6 Mäusen am Tag 7 nach dem T-Zell-Transfer (n = 6); Vergrößerung 100x.

6.2 Literaturverzeichnis

- Abdullah, M., Syam, A.F., Simadibrata, M., Gunawan, J., Makmun, D., and Rani, A.A. (2013). New insights on the pathomechanisms of inflammatory bowel disease. *Journal of digestive diseases* *14*, 455-462.
- Adams, D.H., and Eksteen, B. (2006). Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* *6*, 244-251.
- Afford, S.C., Humphreys, E.H., Reid, D.T., Russell, C.L., Banz, V.M., Oo, Y., Vo, T., Jenne, C., Adams, D.H., and Eksteen, B. (2014). Vascular cell adhesion molecule 1 expression by biliary epithelium promotes persistence of inflammation by inhibiting effector T-cell apoptosis. *Hepatology* *59*, 1932-1943.
- Albert, M.L., Jegathesan, M., and Darnell, R.B. (2001). Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells. *Nature immunology* *2*, 1010-1017.
- Alex, P., Zachos, N.C., Nguyen, T., Gonzales, L., Chen, T.E., Conklin, L.S., Centola, M., and Li, X. (2009). Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* *15*, 341-352.
- Allez, M., Brimnes, J., Dotan, I., and Mayer, L. (2002). Expansion of CD8+ T cells with regulatory function after interaction with intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* *123*, 1516-1526.
- 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*, 515-526.
- Ando, Y., Yang, G.X., Tsuda, M., Kawata, K., Zhang, W., Nakajima, T., Tsuneyama, K., Leung, P., Lian, Z.X., Okazaki, K., *et al.* (2012). The immunobiology of colitis and cholangitis in interleukin-23p19 and interleukin-17a deleted dominant negative form of transforming growth factor beta receptor type ii mice. *Hepatology* *56*, 1418-1426.
- Andrade, M.C., Vaz, N.M., and Faria, A.M. (2003). Ethanol-induced colitis prevents oral tolerance induction in mice. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica* [et al] *36*, 1227-1232.
- Andrew, D.P., Berlin, C., Honda, S., Yoshino, T., Hamann, A., Holzmann, B., Kilshaw, P.J., and Butcher, E.C. (1994). Distinct but overlapping epitopes are involved in alpha 4 beta 7-mediated adhesion to vascular cell adhesion molecule-1, mucosal addressin-1, fibronectin, and lymphocyte aggregation. *Journal of immunology* *153*, 3847-3861.
- Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veecken, J., deRoos, P., Liu, H., Cross, J.R., Pfeffer, K., Coffey, P.J., *et al.* (2013). Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* *504*, 451-455.
- Baaten, B.J., Cooper, A.M., Swain, S.L., and Bradley, L.M. (2013). Location, Location, Location: The Impact of Migratory Heterogeneity on T Cell Function. *Frontiers in immunology* *4*, 311.
- Baaten, B.J., Li, C.R., Deiro, M.F., Lin, M.M., Linton, P.J., and Bradley, L.M. (2010). CD44 regulates survival and memory development in Th1 cells. *Immunity* *32*, 104-115.

- Bayry, J., Thirion, M., Delignat, S., Misra, N., Lacroix-Desmazes, S., Kazatchkine, M.D., and Kaveri, S.V. (2004). Dendritic cells and autoimmunity. *Autoimmunity reviews* *3*, 183-187.
- Behnsen, J., Jellbauer, S., Wong, C.P., Edwards, R.A., George, M.D., Ouyang, W., and Raffatellu, M. (2014). The cytokine IL-22 promotes pathogen colonization by suppressing related commensal bacteria. *Immunity* *40*, 262-273.
- Berglin, L., Bjorkstrom, N.K., and Bergquist, A. (2013). Primary sclerosing cholangitis is associated with autoreactive IgA antibodies against biliary epithelial cells. *Scandinavian journal of gastroenterology* *48*, 719-728.
- Bergquist, A., Ekblom, A., Olsson, R., Kornfeldt, D., Loof, L., Danielsson, A., Hultcrantz, R., Lindgren, S., Prytz, H., Sandberg-Gertzen, H., *et al.* (2002). Hepatic and extrahepatic malignancies in primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* *36*, 321-327.
- 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. *Journal of immunology* *166*, 5430-5438.
- 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*, 1063-1071.
- Biswas, S.K., and Lopez-Collazo, E. (2009). Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends in immunology* *30*, 475-487.
- Bonder, C.S., Norman, M.U., Swain, M.G., Zbytniuk, L.D., Yamanouchi, J., Santamaria, P., Ajuebor, M., Salmi, M., Jalkanen, S., and Kubes, P. (2005). Rules of recruitment for Th1 and Th2 lymphocytes in inflamed liver: a role for alpha-4 integrin and vascular adhesion protein-1. *Immunity* *23*, 153-163.
- Borchers, A.T., Shimoda, S., Bowlus, C., Keen, C.L., and Gershwin, M.E. (2009). Lymphocyte recruitment and homing to the liver in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Seminars in immunopathology* *31*, 309-322.
- Bowen, D., Warren, A., Davis, T., Hoffmann, M., McCaughan, G., Destgroth, B., and Bertolino, P. (2002). Cytokine-dependent bystander hepatitis due to intrahepatic murine CD8+ T-cell activation by bone marrow-derived cells☆. *Gastroenterology* *123*, 1252-1264.
- 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. *The Journal of clinical investigation* *114*, 701-712.
- Brinkman, C.C., Peske, J.D., and Engelhard, V.H. (2013). Peripheral tissue homing receptor control of naive, effector, and memory CD8 T cell localization in lymphoid and non-lymphoid tissues. *Frontiers in immunology* *4*, 241.
- Broz, P., Ohlson, M.B., and Monack, D.M. (2012). Innate immune response to *Salmonella typhimurium*, a model enteric pathogen. *Gut microbes* *3*, 62-70.

- Burgdorf, S., and Kurts, C. (2008). Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. *Current opinion in immunology* *20*, 89-95.
- Bustin, S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology* *25*, 169-193.
- 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*, 1899-1906.
- Cabillic, F., Rougier, N., Basset, C., Lecouillard, I., Quelvenec, E., Toujas, L., Guguen-Guillouzo, C., and Corlu, A. (2006). Hepatic environment elicits monocyte differentiation into a dendritic cell subset directing Th2 response. *J Hepatol* *44*, 552-559.
- Carambia, A., Frenzel, C., Bruns, O.T., Schwinge, D., Reimer, R., Hohenberg, H., Huber, S., Tiegs, G., Schramm, C., Lohse, A.W., *et al.* (2013). Inhibition of inflammatory CD4 T cell activity by murine liver sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol* *58*, 112-118.
- Carambia, A., Freund, B., Schwinge, D., Heine, M., Laschtowitz, A., Huber, S., Wraith, D.C., Korn, T., Schramm, C., Lohse, A.W., *et al.* (2014). TGF-beta-dependent induction of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) Tregs by liver sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol* *61*, 594-599.
- Chen, Y., Jiang, G., Yang, H.R., Gu, X., Wang, L., Hsieh, C.C., Chou, H.S., Fung, J.J., Qian, S., and Lu, L. (2009). Distinct response of liver myeloid dendritic cells to endotoxin is mediated by IL-27. *J Hepatol* *51*, 510-519.
- Cholongitas, E., Shusang, V., Papatheodoridis, G.V., Marelli, L., Manousou, P., Rolando, N., Patch, D., Rolles, K., Davidson, B., and Burroughs, A.K. (2008). Risk factors for recurrence of primary sclerosing cholangitis after liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* *14*, 138-143.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* *162*, 156-159.
- Chuang, Y.H., Lian, Z.X., Cheng, C.M., Lan, R.Y., Yang, G.X., Moritoki, Y., Chiang, B.L., Ansari, A.A., Tsuneyama, K., Coppel, R.L., *et al.* (2005). Increased levels of chemokine receptor CXCR3 and chemokines IP-10 and MIG in patients with primary biliary cirrhosis and their first degree relatives. *Journal of autoimmunity* *25*, 126-132.
- Claessen, M.M., Vleggaar, F.P., Tytgat, K.M., Siersema, P.D., and van Buuren, H.R. (2009). High lifetime risk of cancer in primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* *50*, 158-164.
- Clarke, S.R., Barnden, M., Kurts, C., Carbone, F.R., Miller, J.F., and Heath, W.R. (2000). Characterization of the ovalbumin-specific TCR transgenic line OT-I: MHC elements for positive and negative selection. *Immunology and cell biology* *78*, 110-117.
- Connolly, M.K., Bedrosian, A.S., Malhotra, A., Henning, J.R., Ibrahim, J., Vera, V., Cieza-Rubio, N.E., Hassan, B.U., Pachter, H.L., Cohen, S., *et al.* (2010). In hepatic

fibrosis, liver sinusoidal endothelial cells acquire enhanced immunogenicity. *Journal of immunology* *185*, 2200-2208.

Cording, S., Fleissner, D., Heimesaat, M.M., Bereswill, S., Loddenkemper, C., Uematsu, S., Akira, S., Hamann, A., and Huehn, J. (2013). Commensal microbiota drive proliferation of conventional and Foxp3(+) regulatory CD4(+) T cells in mesenteric lymph nodes and Peyer's patches. *European journal of microbiology & immunology* *3*, 1-10.

Crispe, I.N. (2003). Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol* *3*, 51-62.

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*, 101-118.

Cruickshank, S.M., Southgate, J., Wyatt, J.I., Selby, P.J., and Trejdosiewicz, L.K. (1999). Expression of CD44 on bile ducts in primary sclerosing cholangitis and primary biliary cirrhosis. *Journal of clinical pathology* *52*, 730-734.

Curtsinger, J.M., Lins, D.C., and Mescher, M.F. (2003). Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *J Exp Med* *197*, 1141-1151.

Darji, A., Guzmán, C.A., Gerstel, B., Wachholz, P., Timmis, K.N., Wehland, J., Chakraborty, T., and Weiss, S. (1997). Oral Somatic Transgene Vaccination Using Attenuated *S. typhimurium*. *Cell* *91*, 765-775.

Derkow, K. (2011). Antigenpräsentation und Aktivierung von T-Zellen in der Leber. In *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I (Humboldt-Universität zu Berlin)*.

Derkow, K., Loddenkemper, C., Mintern, J., Kruse, N., Klugewitz, K., Berg, T., Wiedenmann, B., Ploegh, H.L., and Schott, E. (2007). Differential priming of CD8 and CD4 T-cells in animal models of autoimmune hepatitis and cholangitis. *Hepatology* *46*, 1155-1165.

Derkow, K., Muller, A., Eickmeier, I., Seidel, D., Moreira, M.V.R., Kruse, N., Klugewitz, K., Mintern, J., Wiedenmann, B., and Schott, E. (2011). Failure of CD4 T-Cells to Respond to Liver-Derived Antigen and to Provide Help to CD8 T-Cells. *PLoS one* *6*.

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*, 296-305.

Dieleman, L.A., Palmen, M.J.H.J., Akol, H., Bloemena, E., Pena, A.S., Meuwissen, S.G.M., and van Rees, E.P. (1998). Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clinical and experimental immunology* *114*, 385-391.

Eickmeier, I., Seidel, D., Grun, J.R., Derkow, K., Lehnardt, S., Kuhl, A.A., Hamann, A., and Schott, E. (2014). Influence of CD8 T cell priming in liver and gut on the enterohepatic circulation. *J Hepatol* *60*, 1143-1150.

Eigenmann, P.A., Asigbetse, K.E., and Frossard, C.P. (2008). Avirulent *Salmonella typhimurium* strains prevent food allergy in mice. *Clinical and experimental immunology* *151*, 546-553.

- 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*, 1511-1517.
- Eksteen, B., Mora, J.R., Haughton, E.L., Henderson, N.C., Lee-Turner, L., Villablanca, E.J., Curbishley, S.M., Aspinall, A.I., von Andrian, U.H., and Adams, D.H. (2009). Gut homing receptors on CD8 T cells are retinoic acid dependent and not maintained by liver dendritic or stellate cells. *Gastroenterology* *137*, 320-329.
- Erben, U., Loddenkemper, C., Doerfel, K., Spieckermann, S., Haller, D., Heimesaat, M.M., Zeitz, M., Siegmund, B., and Kühl, A.A. (2014). A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. *Int J Clin Exp Pathol* *7*, 4557-4576.
- Erridge, C., Duncan, S.H., Bereswill, S., and Heimesaat, M.M. (2010). The induction of colitis and ileitis in mice is associated with marked increases in intestinal concentrations of stimulants of TLRs 2, 4, and 5. *PloS one* *5*, e9125.
- Farache, J., Koren, I., Milo, I., Gurevich, I., Kim, K.W., Zigmund, E., Furtado, G.C., Lira, S.A., and Shakhar, G. (2013). Luminal bacteria recruit CD103+ dendritic cells into the intestinal epithelium to sample bacterial antigens for presentation. *Immunity* *38*, 581-595.
- Fava, G., Glaser, S., Francis, H., and Alpini, G. (2005). The immunophysiology of biliary epithelium. *Seminars in liver disease* *25*, 251-264.
- Gabele, E., Dostert, K., Hofmann, C., Wiest, R., Scholmerich, J., Hellerbrand, C., and Obermeier, F. (2011). DSS induced colitis increases portal LPS levels and enhances hepatic inflammation and fibrogenesis in experimental NASH. *J Hepatol* *55*, 1391-1399.
- Gallo, R.L., and Hooper, L.V. (2012). Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat Rev Immunol* *12*, 503-516.
- 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*, 2010-2020.
- Ginhoux, F., Liu, K., Helft, J., Bogunovic, M., Greter, M., Hashimoto, D., Price, J., Yin, N., Bromberg, J., Lira, S.A., *et al.* (2009). The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *The Journal of Experimental Medicine* *206*, 3115-3130.
- 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*, 1065-1072.
- 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. *The Lancet* *359*, 150-157.
- Groom, J.R., and Luster, A.D. (2011). CXCR3 in T cell function. *Experimental Cell Research* *317*, 620-631.

- Guidotti, L.G., and Iannacone, M. (2013). Effector CD8 T cell trafficking within the liver. *Molecular immunology* *55*, 94-99.
- Guy-Grand, D., and Vassalli, P. (1993). Gut intraepithelial T lymphocytes. *Current opinion in immunology* *5*, 247-252.
- Hammerich, L., Heymann, F., and Tacke, F. (2011). Role of IL-17 and Th17 cells in liver diseases. *Clinical & developmental immunology* *2011*, 345803.
- Heimesaat, M.M., Fischer, A., Siegmund, B., Kupz, A., Niebergall, J., Fuchs, D., Jahn, H.K., Freudenberg, M., Loddenkemper, C., Batra, A., *et al.* (2007). Shift towards pro-inflammatory intestinal bacteria aggravates acute murine colitis via Toll-like receptors 2 and 4. *PloS one* *2*, e662.
- Hintermann, E., Bayer, M., Pfeilschifter, J.M., Luster, A.D., and Christen, U. (2010). CXCL10 promotes liver fibrosis by prevention of NK cell mediated hepatic stellate cell inactivation. *Journal of autoimmunity* *35*, 424-435.
- Hivroz, C., Chemin, K., Tourret, M., and Bohineust, A. (2012). Crosstalk between T Lymphocytes and Dendritic Cells. *Critical Reviews in Immunology* *32*, 139-155.
- 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*, 17-27.
- Holz, L.E., Bowen, D.G., and Bertolino, P. (2010a). Mechanisms of T cell death in the liver: to Bim or not to Bim? *Dig Dis* *28*, 14-24.
- Holz, L.E., Warren, A., Le Couteur, D.G., Bowen, D.G., and Bertolino, P. (2010b). CD8+ T cell tolerance following antigen recognition on hepatocytes. *Journal of autoimmunity* *34*, 15-22.
- Hopp, A.K., Rupp, A., and Lukacs-Kornek, V. (2014). Self-antigen presentation by dendritic cells in autoimmunity. *Frontiers in immunology* *5*, 55.
- Hsu, W., Zhang, W., Tsuneyama, K., Moritoki, Y., Ridgway, W.M., Ansari, A.A., Coppel, R.L., Lian, Z.X., Mackay, I., and Gershwin, M.E. (2009). Differential mechanisms in the pathogenesis of autoimmune cholangitis versus inflammatory bowel disease in interleukin-2Ralpha(-/-) mice. *Hepatology* *49*, 133-140.
- Huang, F.P., Platt, N., Wykes, M., Major, J.R., Powell, T.J., Jenkins, C.D., and MacPherson, G.G. (2000). A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J Exp Med* *191*, 435-444.
- 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*, 741-749.
- Iwasaki, M., Mukai, T., Gao, P., Park, W.R., Nakajima, C., Tomura, M., Fujiwara, H., and Hamaoka, T. (2001). A critical role for IL-12 in CCR5 induction on T cell receptor-triggered mouse CD4(+) and CD8(+) T cells. *European journal of immunology* *31*, 2411-2420.
- Iwata, M., Hirakiyama, A., Eshima, Y., Kagechika, H., Kato, C., and Song, S.Y. (2004). Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* *21*, 527-538.

- Janssens, S., and Beyaert, R. (2003). Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clinical microbiology reviews* *16*, 637-646.
- Jenne, C.N., and Kubes, P. (2013). Immune surveillance by the liver. *Nature immunology* *14*, 996-1006.
- Joffre, O., Nolte, M.A., Sporri, R., and Reis e Sousa, C. (2009). Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunological reviews* *227*, 234-247.
- Johansson-Lindbom, B., Svensson, M., Wurbel, M.A., Malissen, B., Marquez, G., and Agace, W. (2003). Selective generation of gut tropic T cells in gut-associated lymphoid tissue (GALT): requirement for GALT dendritic cells and adjuvant. *J Exp Med* *198*, 963-969.
- Johansson, C., and Wick, M.J. (2004). Liver dendritic cells present bacterial antigens and produce cytokines upon Salmonella encounter. *Journal of immunology* *172*, 2496-2503.
- John, B., and Crispe, I.N. (2004). Passive and Active Mechanisms Trap Activated CD8+ T Cells in the Liver *The Journal of Immunology* *172* 5222-5229
- Jorgensen, K.K., Grzyb, K., Lundin, K.E., Clausen, O.P., Aamodt, G., Schrupf, E., Vatn, M.H., and Boberg, K.M. (2012). Inflammatory bowel disease in patients with primary sclerosing cholangitis: clinical characterization in liver transplanted and nontransplanted patients. *Inflamm Bowel Dis* *18*, 536-545.
- Karrar, A., Broome, U., Sodergren, T., Jaksch, M., Bergquist, A., Bjornstedt, M., and Sumitran-Holgersson, S. (2007). Biliary epithelial cell antibodies link adaptive and innate immune responses in primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* *132*, 1504-1514.
- 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*, 230-235.
- Kita, H., Lian, Z.X., Van de Water, J., He, X.S., Matsumura, S., Kaplan, M., Luketic, V., Coppel, R.L., Ansari, A.A., and Gershwin, M.E. (2002). Identification of HLA-A2-restricted CD8(+) cytotoxic T cell responses in primary biliary cirrhosis: T cell activation is augmented by immune complexes cross-presented by dendritic cells. *J Exp Med* *195*, 113-123.
- Klein, I., and Crispe, I.N. (2006). Complete differentiation of CD8+ T cells activated locally within the transplanted liver. *J Exp Med* *203*, 437-447.
- Kleindienst, P., Wiethe, C., Lutz, M.B., and Brocker, T. (2005). Simultaneous induction of CD4 T cell tolerance and CD8 T cell immunity by semimature dendritic cells. *Journal of immunology* *174*, 3941-3947.
- 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*, 590-594.
- Knolle, P., Schlaak, J., Uhrig, A., Kempf, P., Meyer zum Buschenfelde, K.H., and Gerken, G. (1995). Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *J Hepatol* *22*, 226-229.

- 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. *Journal of immunology* *162*, 1401-1407.
- Kovvali, G., and Das, K.M. (2005). Molecular mimicry may contribute to pathogenesis of ulcerative colitis. *FEBS letters* *579*, 2261-2266.
- Koyabu, M., Uchida, K., Miyoshi, H., Sakaguchi, Y., Fukui, T., Ikeda, H., Takaoka, M., Hirohara, J., Nishio, A., Uemura, Y., *et al.* (2010). Analysis of regulatory T cells and IgG4-positive plasma cells among patients of IgG4-related sclerosing cholangitis and autoimmune liver diseases. *Journal of gastroenterology* *45*, 732-741.
- Kruse, N., Neumann, K., Schrage, A., Derkow, K., Schott, E., Erben, U., Kuhl, A., Loddenkemper, C., Zeitz, M., Hamann, A., *et al.* (2009). Priming of CD4+ T cells by liver sinusoidal endothelial cells induces CD25^{low} forkhead box protein 3- regulatory T cells suppressing autoimmune hepatitis. *Hepatology* *50*, 1904-1913.
- Kuniyasu, Y., Marfani, S.M., Inayat, I.B., Sheikh, S.Z., and Mehal, W.Z. (2004). Kupffer cells required for high affinity peptide-induced deletion, not retention, of activated CD8+ T cells by mouse liver. *Hepatology* *39*, 1017-1027.
- Kuniyasu, Y., Qamar, A., Sheikh, S.Z., Jhandier, M.N., Hakim, W., and Mehal, W.Z. (2005). Blocking intrahepatic deletion of activated CD8+ T cells by an altered peptide ligand. *Cellular immunology* *238*, 31-37.
- Kunkel, E.J., Campbell, J.J., Haraldsen, G., Pan, J., Boisvert, J., Roberts, A.I., Ebert, E.C., Vierra, M.A., Goodman, S.B., Genovese, M.C., *et al.* (2000). Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. *J Exp Med* *192*, 761-768.
- Kwon, J.H., Keates, S., Bassani, L., Mayer, L.F., and Keates, A.C. (2002). Colonic epithelial cells are a major site of macrophage inflammatory protein 3alpha (MIP-3alpha) production in normal colon and inflammatory bowel disease. *Gut* *51*, 818-826.
- Lacotte, S., Brun, S., Muller, S., and Dumortier, H. (2009). CXCR3, Inflammation, and Autoimmune Diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1173*, 310-317.
- Laroui, H., Ingersoll, S.A., Liu, H.C., Baker, M.T., Ayyadurai, S., Charania, M.A., Laroui, F., Yan, Y., Sitaraman, S.V., and Merlin, D. (2012). Dextran sodium sulfate (DSS) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon. *PLoS one* *7*, e32084.
- Le Bon, A., Etchart, N., Rossmann, C., Ashton, M., Hou, S., Gewert, D., Borrow, P., and Tough, D.F. (2003). Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nature immunology* *4*, 1009-1015.
- Lee, W.Y., and Kubes, P. (2008). Leukocyte adhesion in the liver: distinct adhesion paradigm from other organs. *J Hepatol* *48*, 504-512.

- Lee, Y., Awasthi, A., Yosef, N., Quintana, F.J., Xiao, S., Peters, A., Wu, C., Kleinewietfeld, M., Kunder, S., Hafler, D.A., *et al.* (2012). Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nature immunology* *13*, 991-999.
- Lenzen, H., Weismuller, T.J., Negm, A.A., Wlecke, J., Loges, S., Strassburg, C.P., Manns, M.P., and Lankisch, T.O. (2013). Antineutrophil cytoplasmic antibodies in bile are associated with disease activity in primary sclerosing cholangitis. *Scandinavian journal of gastroenterology* *48*, 1205-1212.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* *7*, 678-689.
- Liaskou, E., Karikoski, M., Reynolds, G.M., Lalor, P.F., Weston, C.J., Pullen, N., Salmi, M., Jalkanen, S., and Adams, D.H. (2011). Regulation of mucosal addressin cell adhesion molecule 1 expression in human and mice by vascular adhesion protein 1 amine oxidase activity. *Hepatology* *53*, 661-672.
- Limmer, A., Ohl, J., Wingender, G., Berg, M., Jungerkes, F., Schumak, B., Djandji, D., Scholz, K., Klevenz, A., Hegenbarth, S., *et al.* (2005). Cross-presentation of oral antigens by liver sinusoidal endothelial cells leads to CD8 T cell tolerance. *European journal of immunology* *35*, 2970-2981.
- Lindner, C., Wahl, B., Fohse, L., Suerbaum, S., Macpherson, A.J., Prinz, I., and Pabst, O. (2012). Age, microbiota, and T cells shape diverse individual IgA repertoires in the intestine. *J Exp Med* *209*, 365-377.
- Liu, J., Jiang, M., Ma, Z., Dietze, K.K., Zelinsky, G., Yang, D., Dittmer, U., Schlaak, J.F., Roggendorf, M., and Lu, M. (2013). TLR1/2 ligand-stimulated mouse liver endothelial cells secrete IL-12 and trigger CD8+ T cell immunity in vitro. *Journal of immunology* *191*, 6178-6190.
- Ljungh, A., and Wadstrom, T. (2002). The role of microorganisms in biliary tract disease. *Current gastroenterology reports* *4*, 167-171.
- Lobb, R.R., and Hemler, M.E. (1994). The Pathophysiologic Role of Alpha-4 Integrins in Vivo. *Journal of Clinical Investigation* *94*, 1722-1728.
- Lupp, C., Robertson, M.L., Wickham, M.E., Sekirov, I., Champion, O.L., Gaynor, E.C., and Finlay, B.B. (2007). Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell host & microbe* *2*, 204.
- Manichanh, C., Borruel, N., Casellas, F., and Guarner, F. (2012). The gut microbiota in IBD. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* *9*, 599-608.
- Mann, E.A., and Saeed, S.A. (2012). Gastrointestinal infection as a trigger for inflammatory bowel disease. *Current opinion in gastroenterology* *28*, 24-29.
- Masopust, D., Vezys, V., Usherwood, E.J., Cauley, L.S., Olson, S., Marzo, A.L., Ward, R.L., Woodland, D.L., and Lefrancois, L. (2004). Activated primary and memory CD8 T cells migrate to nonlymphoid tissues regardless of site of activation or tissue of origin. *Journal of immunology* *172*, 4875-4882.

- Matsuno, K., Nomiya, H., Yoneyama, H., and Uwatoku, R. (2002). Kupffer cell-mediated recruitment of dendritic cells to the liver crucial for a host defense. *Developmental immunology* *9*, 143-149.
- Mazzini, E., Massimiliano, L., Penna, G., and Rescigno, M. (2014). Oral tolerance can be established via gap junction transfer of fed antigens from CX3CR1(+) macrophages to CD103(+) dendritic cells. *Immunity* *40*, 248-261.
- Mazzucchelli, L., Hauser, C., Zraggen, K., Wagner, H.E., Hess, M.W., Laissue, J.A., and Mueller, C. (1996). Differential in situ expression of the genes encoding the chemokines MCP-1 and RANTES in human inflammatory bowel disease. *The Journal of pathology* *178*, 201-206.
- McDonald, B., McAvoy, E.F., Lam, F., Gill, V., de la Motte, C., Savani, R.C., and Kubers, P. (2008). Interaction of CD44 and hyaluronan is the dominant mechanism for neutrophil sequestration in inflamed liver sinusoids. *J Exp Med* *205*, 915-927.
- McNally, A., Hill, G.R., Sparwasser, T., Thomas, R., and Steptoe, R.J. (2011). CD4+CD25+ regulatory T cells control CD8+ T-cell effector differentiation by modulating IL-2 homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 7529-7534.
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* *449*, 819-826.
- 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. *Journal of immunology* *167*, 667-673.
- Mehal, W.Z., Juedes, A.E., and Crispe, I.N. (1999). Selective retention of activated CD8+ T cells by the normal liver. *Journal of immunology* *163*, 3202-3210.
- Michael, A., Stratford, R., Khan, S., Dalglish, A., and Pandha, H. (2004). Novel strains of *Salmonella typhimurium* as potential vectors for gene delivery. *FEMS Microbiol Lett* *238*, 345-351.
- Mintern, J.D., Davey, G.M., Belz, G.T., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2002). Cutting Edge: Precursor Frequency Affects the Helper Dependence of Cytotoxic T Cells. *The Journal of Immunology* *168*, 977-980.
- Mittrücker, H.W., and Kaufmann, S.H.E. (2000). Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *Journal of leukocyte biology* *67*, 457-463.
- Mohamadzadeh, M., DeGrendele, H., Arizpe, H., Estess, P., and Siegelman, M. (1998). Proinflammatory stimuli regulate endothelial hyaluronan expression and CD44/HA-dependent primary adhesion. *The Journal of clinical investigation* *101*, 97-108.
- Moncada, D.M., Kammanadiminti, S.J., and Chadee, K. (2003). Mucin and Toll-like receptors in host defense against intestinal parasites. *Trends in parasitology* *19*, 305-311.
- Mora, J.R., Bono, M.R., Manjunath, N., Weninger, W., Cavanagh, L.L., Roseblatt, M., and Von Andrian, U.H. (2003). Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature* *424*, 88-93.

- Mora, J.R., and von Andrian, U.H. (2006). T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. *Trends in immunology* 27, 235-243.
- Murai, M., Yoneyama, H., Harada, A., Yi, Z., Vestergaard, C., Guo, B., Suzuki, K., Asakura, H., and Matsushima, K. (1999). Active participation of CCR5(+)CD8(+) T lymphocytes in the pathogenesis of liver injury in graft-versus-host disease. *The Journal of clinical investigation* 104, 49-57.
- Murphy, C.T., Nally, K., Shanahan, F., and Melgar, S. (2012). Shining a light on intestinal traffic. *Clinical & developmental immunology* 2012, 808157.
- Naito, Y., Takagi, T., and Yoshikawa, T. (2007). Molecular fingerprints of neutrophil-dependent oxidative stress in inflammatory bowel disease. *Journal of gastroenterology* 42, 787-798.
- Nakajima, C., Mukai, T., Yamaguchi, N., Morimoto, Y., Park, W.R., Iwasaki, M., Gao, P., Ono, S., Fujiwara, H., and Hamaoka, T. (2002). Induction of the chemokine receptor CXCR3 on TCR-stimulated T cells: dependence on the release from persistent TCR-triggering and requirement for IFN-gamma stimulation. *European journal of immunology* 32, 1792-1801.
- Nancey, S., Holvoet, S., Graber, I., Joubert, G., Philippe, D., Martin, S., Nicolas, J.F., Desreumaux, P., Flourie, B., and Kaiserlian, D. (2006). CD8+ cytotoxic T cells induce relapsing colitis in normal mice. *Gastroenterology* 131, 485-496.
- Nandi, A., Estess, P., and Siegelman, M.H. (2000). Hyaluronan anchoring and regulation on the surface of vascular endothelial cells is mediated through the functionally active form of CD44. *The Journal of biological chemistry* 275, 14939-14948.
- Neefjes, J., Jongsma, M.L., Paul, P., and Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 11, 823-836.
- Nell, S., Suerbaum, S., and Josenhans, C. (2010). The impact of the microbiota on the pathogenesis of IBD: lessons from mouse infection models. *Nature reviews Microbiology* 8, 564-577.
- Neurath, M.F. (2014). Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 14, 329-342.
- Numata, Y., Tazuma, S., Nishioka, T., Ueno, Y., and Chayama, K. (2004). Immune response in mouse experimental cholangitis associated with colitis induced by dextran sulfate sodium. *Journal of gastroenterology and hepatology* 19, 910-915.
- O'Mahony, C.A., and Vierling, J.M. (2006). Etiopathogenesis of primary sclerosing cholangitis. *Seminars in liver disease* 26, 3-21.
- Oka, S., Mori, N., Matsuyama, S., Takamori, Y., and Kubo, K. (2000). Presence of B220 within thymocytes and its expression on the cell surface during apoptosis. *Immunology* 100, 417-423.
- Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., and Nakaya, R. (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98, 694-702.

- Oo, Y.H., and Adams, D.H. (2010). The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver. *Journal of autoimmunity* *34*, 45-54.
- Pabst, O., and Mowat, A.M. (2012). Oral tolerance to food protein. *Mucosal immunology* *5*, 232-239.
- Papadakis, K.A., Prehn, J., Moreno, S.T., Cheng, L., Kouroumalis, E.A., Deem, R., Breaverman, T., Ponath, P.D., Andrew, D.P., Green, P.H.R., *et al.* (2001). CCR9-Positive Lymphocytes and Thymus-Expressed Chemokine Distinguish Small Bowel From Colonic Crohn's Disease. *Gastroenterology* *121*, 246-254.
- Papadakis, K.A., Prehn, J., Zhu, D., Landers, C., Gaiennie, J., Fleshner, P.R., and Targan, S.R. (2004). Expression and regulation of the chemokine receptor CXCR3 on lymphocytes from normal and inflammatory bowel disease mucosa. *Inflamm Bowel Dis* *10*, 778-788.
- Penz-Osterreicher, M., Osterreicher, C.H., and Trauner, M. (2011). Fibrosis in autoimmune and cholestatic liver disease. *Best practice & research Clinical gastroenterology* *25*, 245-258.
- Peterson, L.W., and Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* *14*, 141-153.
- Pollheimer, M.J., Halilbasic, E., Fickert, P., and Trauner, M. (2011a). Pathogenesis of primary sclerosing cholangitis. *Best practice & research Clinical gastroenterology* *25*, 727-739.
- Pollheimer, M.J., Trauner, M., and Fickert, P. (2011f). Will we ever model PSC? - "it's hard to be a PSC model!". *Clinics and research in hepatology and gastroenterology* *35*, 792-804.
- Ponsioen, C.Y., Defoer, J., Ten Kate, F.J., Weverling, G.J., Tytgat, G.N., Pannekoek, Y., and Wertheim-Dillen, P.M. (2002). A survey of infectious agents as risk factors for primary sclerosing cholangitis: are Chlamydia species involved? *European journal of gastroenterology & hepatology* *14*, 641-648.
- Ponsioen, C.Y., Kuiper, H., Ten Kate, F.J., van Milligen de Wit, M., van Deventer, S.J., and Tytgat, G.N. (1999). Immunohistochemical analysis of inflammation in primary sclerosing cholangitis. *European journal of gastroenterology & hepatology* *11*, 769-774.
- Powrie, F., Correa-Oliveira, R., Mauze, S., and Coffman, R.L. (1994). Regulatory interactions between CD45RB^{high} and CD45RB^{low} CD4⁺ T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. *J Exp Med* *179*, 589-600.
- Qimron, U., Madar, N., Mittrucker, H.W., Zilka, A., Yosef, I., Bloushtain, N., Kaufmann, S.H., Rosenshine, I., Apte, R.N., and Porgador, A. (2004). Identification of Salmonella typhimurium genes responsible for interference with peptide presentation on MHC class I molecules: Deltayej Salmonella mutants induce superior CD8⁺ T-cell responses. *Cellular microbiology* *6*, 1057-1070.
- Qin, S., Rottman, J.B., Myers, P., Kassam, N., Weinblatt, M., Loetscher, M., Koch, A.E., Moser, B., and Mackay, C.R. (1998). The chemokine receptors CXCR3 and CCR5

- mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* *101*, 746-754.
- Raupach, B., and Kaufmann, S.H.E. (2001). Bacterial virulence, proinflammatory cytokines and host immunity: how to choose the appropriate *Salmonella* vaccine strain? *Microbes and Infection* *3*, 1261-1269.
- Reis e Sousa, C. (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* *6*, 476-483.
- Renno, T., Attinger, A., Rimoldi, D., Hahne, M., Tschopp, J., and MacDonald, H.R. (1998). Expression of B220 on activated T cell blasts precedes apoptosis. *European journal of immunology* *28*, 540-547.
- Reynoso, E.D., Elpek, K.G., Francisco, L., Bronson, R., Bellemare-Pelletier, A., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., and Turley, S.J. (2009). Intestinal tolerance is converted to autoimmune enteritis upon PD-1 ligand blockade. *Journal of immunology* *182*, 2102-2112.
- Rivera-Nieves, J., Olson, T., Bamias, G., Bruce, A., Solga, M., Knight, R.F., Hoang, S., Cominelli, F., and Ley, K. (2005). L-Selectin, $\alpha 4 \beta 7$ Integrins Participate in CD4+ T Cell Recruitment to Chronically Inflamed Small Intestine. *The Journal of Immunology* *174*, 2343-2352.
- Rowe, J.H., Ertelt, J.M., and Way, S.S. (2012). Foxp3(+) regulatory T cells, immune stimulation and host defence against infection. *Immunology* *136*, 1-10.
- Rutella, S., Bonanno, G., Procoli, A., Mariotti, A., de Ritis, D.G., Curti, A., Danese, S., Pessina, G., Pandolfi, S., Natoni, F., *et al.* (2006). Hepatocyte growth factor favors monocyte differentiation into regulatory interleukin (IL)-10++IL-12low/neg accessory cells with dendritic-cell features. *Blood* *108*, 218-227.
- Santos, R.L. (2014). Pathobiology of salmonella, intestinal microbiota, and the host innate immune response. *Frontiers in immunology* *5*, 252.
- Sato, T., Habtezion, A., Beilhack, A., Schulz, S., Butcher, E., and Thorlacius, H. (2006). Short-term homing assay reveals a critical role for lymphocyte function-associated antigen-1 in the hepatic recruitment of lymphocytes in graft-versus-host disease. *J Hepatol* *44*, 1132-1140.
- Schildberg, F.A., Hegenbarth, S.I., Schumak, B., Scholz, K., Limmer, A., and Knolle, P.A. (2008). Liver sinusoidal endothelial cells veto CD8 T cell activation by antigen-presenting dendritic cells. *European journal of immunology* *38*, 957-967.
- Schuetz, V., and Burgdorf, S. (2014). The ins-and-outs of endosomal antigens for cross-presentation. *Current opinion in immunology* *26*, 63-68.
- Schurich, A., Berg, M., Stabenow, D., Bottcher, J., Kern, M., Schild, H.J., Kurts, C., Schuetz, V., Burgdorf, S., Diehl, L., *et al.* (2010). Dynamic regulation of CD8 T cell tolerance induction by liver sinusoidal endothelial cells. *Journal of immunology* *184*, 4107-4114.
- Shao, L., Serrano, D., and Mayer, L. (2001). The role of epithelial cells in immune regulation in the gut. *Seminars in immunology* *13*, 163-176.
- Shields, P.L., Morland, C.M., Salmon, M., Qin, S.X., Hubscher, S.G., and Adams, D.H. (1999). Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for

selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *Journal of immunology* *163*, 6236-6243.

Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A.M., *et al.* (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* *68*, 855-867.

Shortman, K., and Heath, W.R. (2010). The CD8+ dendritic cell subset. *Immunological reviews* *234*, 18-31.

Singh, U.P., Venkataraman, C., Singh, R., and Lillard, J.W., Jr. (2007). CXCR3 axis: role in inflammatory bowel disease and its therapeutic implication. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets* *7*, 111-123.

Soriano, N., Panes, J., Salas, A., Salas, A., Sans, M., Gironella, M., Elena, M., Anderson, D.C., and Pique, J.M. (2000). VCAM-1, but not ICAM-1 or MAdCAM-1, immunoblockade ameliorates DSS-induced colitis in mice. *Gastroenterology* *118*, A576-A576.

Sporri, R., and Reis e Sousa, C. (2005). Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. *Nature immunology* *6*, 163-170.

Stecher, B., Paesold, G., Barthel, M., Kremer, M., Jantsch, J., Stallmach, T., Heikenwalder, M., and Hardt, W.D. (2006). Chronic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium-induced colitis and cholangitis in streptomycin-pretreated Nramp1+/+ mice. *Infect Immun* *74*, 5047-5057.

Stecher, B., Robbiani, R., Walker, A.W., Westendorf, A.M., Barthel, M., Kremer, M., Chaffron, S., Macpherson, A.J., Buer, J., Parkhill, J., *et al.* (2007). *Salmonella enterica* serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS biology* *5*, 2177-2189.

Steinhoff, U., Brinkmann, V., Klemm, U., Aichele, P., Seiler, P., Brandt, U., Bland, P.W., Prinz, I., Zugel, U., and Kaufmann, S.H. (1999). Autoimmune intestinal pathology induced by hsp60-specific CD8 T cells. *Immunity* *11*, 349-358.

Stenstad, H., Ericsson, A., Johansson-Lindbom, B., Svensson, M., Marsal, J., Mack, M., Picarella, D., Soler, D., Marquez, G., Briskin, M., *et al.* (2006). Gut-associated lymphoid tissue-primed CD4+ T cells display CCR9-dependent and -independent homing to the small intestine. *Blood* *107*, 3447-3454.

Stenstad, H., Svensson, M., Cucak, H., Kotarsky, K., and Agace, W.W. (2007). Differential homing mechanisms regulate regionalized effector CD8 α beta+ T cell accumulation within the small intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 10122-10127.

Strober, W. (2013). Impact of the gut microbiome on mucosal inflammation. *Trends in immunology* *34*, 423-430.

Sun, H., Liu, J., Zheng, Y., Pan, Y., Zhang, K., and Chen, J. (2014). Distinct chemokine signaling regulates integrin ligand specificity to dictate tissue-specific lymphocyte homing. *Developmental cell* *30*, 61-70.

- Sundquist, M., and Wick, M.J. (2005). TNF- α -Dependent and α -Independent Maturation of Dendritic Cells and Recruited CD11c^{int}CD11b⁺ Cells during Oral Salmonella Infection. *The Journal of Immunology* *175*, 3287-3298.
- Tabibian, J.H., Talwalkar, J.A., and Lindor, K.D. (2013). Role of the microbiota and antibiotics in primary sclerosing cholangitis. *BioMed research international* *2013*, 389537.
- Tajima, M., Wakita, D., Noguchi, D., Chamoto, K., Yue, Z., Fugo, K., Ishigame, H., Iwakura, Y., Kitamura, H., and Nishimura, T. (2008). IL-6-dependent spontaneous proliferation is required for the induction of colitogenic IL-17-producing CD8⁺ T cells. *J Exp Med* *205*, 1019-1027.
- Tam, M.A., Sundquist, M., and Wick, M.J. (2008). MyD88 and IFN- α differentially control maturation of bystander but not Salmonella-associated dendritic cells or CD11c^{int}CD11b⁺ cells during infection. *Cellular microbiology* *10*, 1517-1529.
- Tay, S.S., Wong, Y.C., McDonald, D.M., Wood, N.A., Roediger, B., Siero, F., McGuffog, C., Alexander, I.E., Bishop, G.A., Gamble, J.R., *et al.* (2014). Antigen expression level threshold tunes the fate of CD8 T cells during primary hepatic immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *111*, E2540-2549.
- Teramoto, K., Miura, S., Tsuzuki, Y., Hokari, R., Watanabe, C., Inamura, T., Ogawa, T., Hosoe, N., Nagata, H., Ishii, H., *et al.* (2005). Increased lymphocyte trafficking to colonic microvessels is dependent on MAdCAM-1 and C-C chemokine mLARC/CCL20 in DSS-induced mice colitis. *Clinical and experimental immunology* *139*, 421-428.
- Terjung, B., Sohne, J., Lechtenberg, B., Gottwein, J., Muennich, M., Herzog, V., Mahler, M., Sauerbruch, T., and Spengler, U. (2010). p-ANCA in autoimmune liver disorders recognise human beta-tubulin isotype 5 and cross-react with microbial protein FtsZ. *Gut* *59*, 808-816.
- Terjung, B., and Spengler, U. (2009). Atypical p-ANCA in PSC and AIH: a hint toward a "leaky gut"? *Clinical reviews in allergy & immunology* *36*, 40-51.
- Thomson, A.W., and Knolle, P.A. (2010). Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat Rev Immunol* *10*, 753-766.
- Torgerson, T.R. (2006). Regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Springer seminars in immunopathology* *28*, 63-76.
- Trivedi, P.J., and Adams, D.H. (2013). Mucosal immunity in liver autoimmunity: a comprehensive review. *Journal of autoimmunity* *46*, 97-111.
- Umeshappa, C.S., Nanjundappa, R.H., Xie, Y., Freywald, A., Xu, Q., and Xiang, J. (2013). Differential requirements of CD4(+) T-cell signals for effector cytotoxic T-lymphocyte (CTL) priming and functional memory CTL development at higher CD8(+) T-cell precursor frequency. *Immunology* *138*, 298-306.
- Vezyz, V., and Lefrancois, L. (2002). Cutting edge: inflammatory signals drive organ-specific autoimmunity to normally cross-tolerizing endogenous antigen. *Journal of immunology* *169*, 6677-6680.

- Vezyz, V., Olson, S., and Lefrancois, L. (2000). Expression of intestine-specific antigen reveals novel pathways of CD8 T cell tolerance induction. *Immunity* *12*, 505-514.
- 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*, 1664-1672.
- Wahl, C., Bochtler, P., Chen, L., 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*, 980-988.
- Walsh, K.P., and Mills, K.H. (2013). Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. *Trends in immunology* *34*, 521-530.
- 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*, 1182-1190.
- Westendorf, A.M., Fleissner, D., Deppenmeier, S., Gruber, A.D., Bruder, D., Hansen, W., Liblau, R., and Buer, J. (2006). Autoimmune-mediated intestinal inflammation-impact and regulation of antigen-specific CD8+ T cells. *Gastroenterology* *131*, 510-524.
- Wiesel, M., and Oxenius, A. (2012). From crucial to negligible: functional CD8(+) T-cell responses and their dependence on CD4(+) T-cell help. *European journal of immunology* *42*, 1080-1088.
- Wing, K., and Sakaguchi, S. (2010). Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nature immunology* *11*, 7-13.
- Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B., and Neurath, M.F. (2007). Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nature protocols* *2*, 541-546.
- Wirtz, S., and Neurath, M.F. (2007). Mouse models of inflammatory bowel disease. *Advanced drug delivery reviews* *59*, 1073-1083.
- 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. *The Journal of clinical investigation* *99*, 2782-2790.
- Worthington, J., and Chapman, R. (2006). Primary sclerosing cholangitis. *Orphanet journal of rare diseases* *1*, 41.
- Wu, C.J., Chen, L.C., and Kuo, M.L. (2006). Attenuated *Salmonella typhimurium* reduces ovalbumin-induced airway inflammation and T-helper type 2 responses in mice. *Clinical and experimental immunology* *145*, 116-122.
- Yang, G.X., Lian, Z.X., Chuang, Y.H., Moritoki, Y., Lan, R.Y., Wakabayashi, K., Ansari, A.A., Flavell, R.A., Ridgway, W.M., Coppel, R.L., *et al.* (2008). Adoptive transfer of CD8(+) T cells from transforming growth factor beta receptor type II (dominant negative form) induces autoimmune cholangitis in mice. *Hepatology* *47*, 1974-1982.
- You, Q., Cheng, L., Kedl, R.M., and Ju, C. (2008). Mechanism of T cell tolerance induction by murine hepatic Kupffer cells. *Hepatology* *48*, 978-990.

- Yrlid, U., Cerovic, V., Milling, S., Jenkins, C.D., Zhang, J., Crocker, P.R., Klavinskis, L.S., and MacPherson, G.G. (2006). Plasmacytoid dendritic cells do not migrate in intestinal or hepatic lymph. *Journal of immunology* *177*, 6115-6121.
- Zelenay, S., and Reis e Sousa, C. (2013). Adaptive immunity after cell death. *Trends in immunology* *34*, 329-335.
- Zhang, N., and Bevan, Michael J. (2011). CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. *Immunity* *35*, 161-168.
- Zhang, W., Fei, Y., Gao, J., Liu, B., and Zhang, F. (2011). The role of CXCR3 in the induction of primary biliary cirrhosis. *Clinical & developmental immunology* *2011*, 564062.
- Zhang, W., Sharma, R., Ju, S.T., He, X.S., Tao, Y., Tsuneyama, K., Tian, Z., Lian, Z.X., Fu, S.M., and Gershwin, M.E. (2009). Deficiency in regulatory T cells results in development of antimicrobial antibodies and autoimmune cholangitis. *Hepatology* *49*, 545-552.
- Zhang, W., Tsuda, M., Yang, G.X., Tsuneyama, K., Rong, G., Ridgway, W.M., Ansari, A.A., Flavell, R.A., Coppel, R.L., Lian, Z.X., *et al.* (2010). Deletion of interleukin-6 in mice with the dominant negative form of transforming growth factor beta receptor II improves colitis but exacerbates autoimmune cholangitis. *Hepatology* *52*, 215-222.

6.3 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Eckart Schott für die engagierte Unterstützung und Betreuung dieser Arbeit. Seine konstruktiven Anregungen, die kritischen Diskussionen sowie die von ihm gleichzeitig gewährte Freiheit, haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Die einzigartige Möglichkeit zur Teilnahme an internationalen Kongressen erlaubte es mir, Zwischenergebnisse zu präsentieren und neueste Entwicklungen aufzunehmen.

Ich danke Prof. Dr. Roland Lauster für die freundliche und unkomplizierte Betreuung meiner Arbeit an der Technischen Universität Berlin.

Allen Mitarbeitern der Forschungsabteilung Hepatologie und Gastroenterologie danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme, offene Atmosphäre. An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders herzlich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Schott - Ira Eickmeier, Katja Derkow, Anja Müller und Mathias Riehn - für die gegenseitige, unschätzbare Hilfe im Labor sowie für die fruchtbaren Diskussionen, Ideen und Vorschläge bedanken.

Ich danke außerdem Toralf Kaiser und Katharina Raba für ihre professionelle Hilfe bei der FACS-Zellsortierung sowie Dr. Anja Kühl, Simone Spieckermann und Prof. Dr. Loddenkemper für ihre hervorragende Hilfe bei den histologischen Färbungen. Ich danke Cordula Dierkes für ihre freundliche Unterstützung bei der Endoskopie. Ich danke Ira Eickmeier, Heike Dornhoff und Ulrike Erben für das geduldige Korrekturlesen dieser Arbeit. Besonders danke ich Ulrike Erben für ihre darüber hinausgehende Hilfsbereitschaft und für ihre wertvollen Ratschläge zur Erstellung des Manuskripts. Ferner danke ich allen Tierpflegern für die Betreuung und Zucht der Mäuse.

Ganz besonders großer Dank gilt meiner Partnerin Judith, meinen Freunden und meiner Familie. Eure Liebe, eure Geduld, euer Verständnis und euer Rückhalt haben mir diese Arbeit erst ermöglicht.

6.4 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Geburtsdatum, - Ort: 1979, Berlin
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Ausbildung / Tätigkeiten

09. 2007 – 09.2013 Dissertation, Charité Universitätsmedizin, AG E. Schott
Graduiertenkolleg des Sonderforschungsbereichs 633

02. 2006 – 08. 2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, AG M. Neurath
Universität Mainz, I. Medizinische Klinik

12. 2005 Diplom, Abschluss: Dipl.-Ing., Gesamturteil: gut - 1,6

7. 2003 – 06. 2004 Diplomarbeit, AG U. Steinhoff
Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Note: 1,0

05. 2002 – 08. 2004 Studentische Hilfskraft: Jerini AG, Abteilung Peptide
Technologies

10. 1998 – 12. 2005 Studium des Diplomstudienganges medizinische
Biotechnologie, Technische Universität Berlin

09. 1991 – 06. 1998 Gymnasiale Oberstufe, Kienbergoberschule Berlin,
Abschluss: Abitur, Note: 1,8

16. Mai 2015

6.5 Publikationen

Mittrücker, H.W., **Seidel, D.**, Bland, P.W., Zarzycka, A., Kaufmann, S.H., Visekruna, A., and Steinhoff, U. (2014). *Lack of microbiota reduces innate responses and enhances adaptive immunity against Listeria monocytogenes infection*. Eur J Immunol 44, 1710-1715.

Eickmeier, I., **Seidel, D.**, Grün, J. R., Derkow, K., Lehnardt, S., Kühl, A. A., Hamann, A., and Schott, E. (2014) *Influence of CD8 T cell priming in liver and gut on the enterohepatic circulation*. J Hepatol. 60(6), 1143-50

Seidel, D., Eickmeier, I., Kühl, A.A., Hamann, A., Loddenkemper, C., and Schott, E. (2014). *CD8 T cells primed in the gut-associated lymphoid tissue induce immune-mediated cholangitis in mice*. Hepatology. 59(2), 601-11

Derkow, K., Müller, A., Eickmeier, I., **Seidel, D.**, Rust Moreira, M.V., Kruse, N., Klugewitz, K., Mintern, J., Wiedenmann, B., and Schott, E. (2011). *Failure of CD4 T-cells to respond to liver-derived antigen and to provide help to CD8 T-cells*. PloS one 6, e21847.

Waldner, M.J., Wirtz, S., Becker, C., **Seidel, D.**, Tubbe, I., Cappel, K., Hahnel, P.S., Galle, P.R., Schuler, M., and Neurath, M.F. (2010). *Perforin deficiency attenuates inflammation and tumor growth in colitis-associated cancer*. Inflamm Bowel Dis 16, 559-567.

Weigmann, B., Tubbe, I., **Seidel, D.**, Nicolaev, A., Becker, C., and Neurath, M.F. (2007). *Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue*. Nature protocols 2, 2307-2311.

Visekruna, A., Joeris, T., **Seidel, D.**, Kroesen, A., Loddenkemper, C., Zeitz, M., Kaufmann, S.H., Schmidt-Ullrich, R., and Steinhoff, U. (2006). *Proteasome-mediated degradation of IkappaBalpha and processing of p105 in Crohn disease and ulcerative colitis*. The Journal of clinical investigation 116, 3195-3203.

Duta, F., Ulanova, M., **Seidel, D.**, Puttagunta, L., Musat-Marcu, S., Harrod, K.S., Schreiber, A.D., Steinhoff, U., and Befus, A.D. (2006). *Differential expression of spleen tyrosine kinase Syk isoforms in tissues: Effects of the microbial flora*. Histochemistry and cell biology 126, 495-505.

Kongressbeiträge

Seidel, D., Eickmeier, I., Kühl, A.A., Loddenkemper, C., and Schott, E. (2013) *CD8 T cells primed in the gut-associated lymphoid tissue induce immune-mediated cholangitis in mice*. Tagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft Chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Präsentation

Seidel, D., Eickmeier, I., Kühl, A.A., Wiedenmann, B., and Schott, E. (2012) *Salmonella infection promotes cross reaction of gut activated T cells against liver antigen, leading to immune-mediated cholangitis in mice*. 3rd European Congress of Immunology, Poster P1011

Seidel, D., Eickmeier, I., Kühl, A.A., Loddenkemper, C., Wiedenmann, B., and Schott, E. (2012) *Chronic colitis promotes the initiation of autoimmune cholangitis in mice*. EASL Monothematic Conference: Immune Mediated Liver Injury, Poster

Seidel, D., Eickmeier, I., Derkow K., Loddenkemper, C., Wiedenmann, B., and Schott, E. (2010) *Local activation of antigen-specific CD8 T cells in the gut leads to autoimmune cholangitis*. 7th European mucosal immunology group meeting, Poster 29

Seidel, D., Eickmeier, I., Derkow K., Loddenkemper, C., and Schott, E. (2009) *Local activation of antigen-specific CD8 T cells by exogenous antigen leads to colitis*. 2nd European Congress of Immunology Poster PC17/14

6.6 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation selbstständig verfasst habe. Alle benutzten Quellen und Hilfsmittel sind aufgeführt und die Angaben zu den Eigenanteilen bei Co-Autorenschaft sind zutreffend.

Daniel Seidel