

Antrag auf Forschungsförderung durch die UKE Stiftung

## Gewebe-residente naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit Neigung zur Effektorfunktion in immun-vermittelten Lebererkrankungen

### Antragstellerin

Dr. med. Jenny Krause  
Sillestraße 40  
20257 Hamburg  
Telefon: +49 152 22826824  
Email: [je.krause@uke.de](mailto:je.krause@uke.de)

### 1. Zusammenfassung

Durch Viren, Stoffwechsel- oder Immunerkrankungen verursachte Lebererkrankungen belasten zunehmend das globale Gesundheitssystem. Die Prävalenz immunvermittelter Lebererkrankungen nimmt zu, ihre Pathogenese ist jedoch kaum bekannt und es gibt keine kausale Therapie<sup>1</sup>. Die Entschlüsselung der Zusammensetzung der Parenchymzellen in der Leber hat das Verständnis der menschlichen Leberphysiologie erheblich verbessert<sup>2</sup>, allerdings ist über die Zusammensetzung intrahepatischer Immunzellen und vor allem über ihren Beitrag zu immunvermittelten Lebererkrankungen wenig bekannt.

**Die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) ist eine rätselhafte und fortschreitende Lebererkrankung mit unklarer Pathogenese und fehlenden Therapieoptionen<sup>1</sup>. Starke HLA-Assoziationen deuten auf eine Beteiligung des adaptiven Immunsystems<sup>3</sup> und insbesondere des T-Zell-Kompartiments hin<sup>3</sup>. Innerhalb der Klinischen Forschungsgruppe (KFO306) „Primär Sklerosierende Cholangitis“ unter der Aufsicht von Prof. Nicola Gagliani und Prof. Christoph Schramm, haben wir die Heterogenität des intrahepatischen T-Zell-Kompartiments bei entzündlichen Lebererkrankungen untersucht.** Hierbei konnten wir sowohl die Expertise in Bezug auf entzündliche Lebererkrankungen und Immunität, verschiedene innovative Forschungsmethoden, sowie die einzigartige Kohorte von Patienten, die im YAEL-Zentrum für autoimmune Lebererkrankungen der I. Medizinische Klinik und Poliklinik gesehen wurden, nutzen. Um die Zusammensetzung intrahepatischer T-Zellen zu untersuchen und ihre Funktion besser zu verstehen, haben wir verschiedene innovative Einzelzell-RNA-Sequenzierungsmethoden verwendet, die erst kürzlich etabliert wurden. **Durch die Erzeugung des ersten Immunzellatlas menschlicher T-Zellen aus entzündeten Lebern konnten wir eine zuvor unbekannt Population von Gewebe-residenten naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen identifizieren. Durch die Kombination von Trajectory-Algorithmien mit funktionellen Experimenten haben wir bewiesen, dass diese neue Zellpopulation dazu neigt, einen pathogenen T<sub>H</sub>17-Polarisationszustand zu erlangen.** Die Implikation von Mikrobiota-induzierten T<sub>H</sub>17-Zellen in der Pathogenese immunvermittelter Lebererkrankungen macht diese naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu einem potenziell attraktiven therapeutischen Ziel.

**Aktuell ist noch unbekannt, welche Faktoren die Entstehung und das Verbleiben dieser naiven, gewebeständigen T Zellpopulation begünstigen.** Hierfür werden wir epigenetische Veränderungen dieser Zellen untersuchen und mittels einer neuen Technik *in situ* die Expression von Genen im Lebergewebe ortsständig bestimmen. Hierdurch werden wir lernen, wie die Mikroumgebung im entzündeten Gewebe diese Zellpopulation begünstigt. Diese Experimente werden hier beantragt. Sie werden dazu führen, dass dieses Projekt zeitnah abgeschlossen und veröffentlicht werden kann.

Unsere Ergebnisse liefern einen Ausblick auf einen relevanten klinischen Fortschritt: Wir haben eine bisher unbekannt Population von Leber-residenten naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei immun-vermittelten Lebererkrankungen entdeckt. Dies ist ein breites wissenschaftliches Thema, das über entzündliche Lebererkrankungen hinausgeht und für das Verständnis von Immunität und Entzündung in Organen von grundlegender Bedeutung ist und darüber hinaus die Verbindung zwischen Autoimmunität und Mikrobiota verstärkt. Unsere Ergebnisse werden einen Fortschritt für den Forschungsschwerpunkt zu Entzündung und Infektion (C3i) am UKE erbringen und damit auch anderen Bereichen zugute kommen.

### Stand der Forschung

Die PSC ist eine seltene Lebererkrankung mit steigender Inzidenz, die aufgrund fehlender therapeutischer Möglichkeiten zum Tod oder zur Lebertransplantation führt<sup>1</sup>. Die Pathogenese ist noch wenig bekannt. Genomweite Assoziationsstudien haben eine starke HLA-Assoziation gezeigt, was auf die Beteiligung des adaptiven Immunsystems hindeutet<sup>3</sup>. Übereinstimmend wurde von der Gruppe von Prof. Schramm über eine verringerte Anzahl an regulatorischen T-Zellen (T<sub>REG</sub>) und eine erhöhte IL-17-Produktion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (T<sub>H</sub>17) im peripheren Blut bei PSC Patienten berichtet<sup>4,5</sup>. Kürzlich wurde gezeigt, dass von PSC-Patienten stammende Darmmikrobiota in Mausmodellen der sklerosierenden Cholangitis T<sub>H</sub>17-Zellen induzieren, die eine Leberentzündung auslösen<sup>6</sup>. Darüber hinaus führte die Gruppe von Prof. Schramm eine eingehende Analyse der verschiedenen biliären Mikrobiota bei PSC durch, die eine geringere Diversität und eine höhere Häufigkeit spezifischer Krankheitserreger ergab<sup>7</sup>. Die Plastizität pathogener T<sub>H</sub>17-Zellen bei Entzündungen<sup>8</sup>, sowie gewebespezifische Phänotypen von T-Zellen, die zu Defekten der Immuntoleranz<sup>9</sup> führen, wurden von der Gruppe von Prof. Gagliani beschrieben.

### Vorarbeiten

Durch die Kombination verschiedener Einzelzell-RNA-Sequenzierungsmethoden entwickelten wir den ersten Atlas intrahepatischer T-Zellen bei Lebererkrankungen (Abb. 1ac). Dieser war die Grundlage, eine zuvor unbekannt Population naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu identifizieren (Abb. 1d+e), die eine transkriptomische Signatur für Geweberesidenz aufwies (Abb. 2 a-c) und sich in direkter Nähe zu den entzündeten Gallengängen in PSC Lebern befanden (Abb. 2d). Wir konnten zeigen, dass diese Population auch bei anderen Lebererkrankungen vorhanden ist, in PSC-Patienten war sie jedoch vermehrt vorhanden (Abb. 2e). Weiterhin wies diese naive CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation *in silico* eine Neigung zu einem Entwicklungsverlauf zu T<sub>H</sub>17-polarisierten Effektorzellen auf (3a-b), was wir durch funktionelle Experimente bestätigen konnten (3c-f). Es ist bekannt, dass T<sub>H</sub>17-Zellen Autoimmunerkrankungen verursachen, und Mikrobiota-induzierte T<sub>H</sub>17-Zellen wurden kürzlich für die PSC-Pathogenese mitverantwortlich gemacht<sup>10</sup>. In Anbetracht der Tatsache, dass T<sub>H</sub>17-Zellen auf biliäre Mikrobiota reagieren und dass die Mikrobiota eine wichtige Rolle bei entzündlichen Lebererkrankungen spielen, deutet dies stark darauf hin, dass diese naive CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation einen potenziellen Beitrag zu entzündlichen Lebererkrankungen leistet.

### Projektziele mit Forschungshypothesen

Die Untersuchung des Entwicklungsverlaufs naiver T-Zellen ist bisher größtenteils auf sekundäre lymphatische Organe beschränkt gewesen<sup>11</sup>. Das Entwicklungsmuster von humanen naiven T-Zellen, die sich in nicht-lymphatischen Geweben befinden, ist noch nie untersucht worden. Ob diese neue Zellpopulation zu immun-vermittelten Lebererkrankung beiträgt, ist daher unbekannt. Wir glauben, dass diese neuartige Population von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine wichtige First-Line-Antwort auf zuvor nicht erkannte Antigene in der Leber darstellt. Wir nehmen an, dass sie zu einer immunvermittelten Lebererkrankung beitragen, indem sie als Reaktion auf Gallenmikrobiota in Richtung pathogener T<sub>H</sub>17-Zellen polarisieren. Das aktuelle Dogma besagt jedoch, dass naive T-Zellen in den Lymphknoten aktiviert werden und je nach Stimulus zu verschiedenen Arten von Effektorzellen

polarisieren<sup>12</sup>. Die Aktivierung und Polarisierung von naiven T-Zellen in nicht-lymphoiden Geweben wurde bisher nicht beschrieben.

**Ziel 1:** Zu testen, ob Leber-residente naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen epigenetisch prädisponiert sind, um den Polarisationszustand von T<sub>H</sub>17-Zellen zu erreichen.

**Ziel 2:** Identifikation der stromalen und antigenpräsentierenden Zellen der Leber, welche die Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu T<sub>H</sub>17-Zellen begünstigen.

Diese Ergebnisse werden zu dem Verständnis von T-Zellen im Gewebe bei immunvermittelten Lebererkrankungen beitragen und Hinweise auf die Rolle von naiven T-Zellen in nicht-lymphatischen Geweben liefern, einer Zellpopulation über dessen Rolle bisher lediglich spekuliert wurde<sup>12</sup>. Die Ergebnisse könnten außerdem therapeutische Implikationen haben, da die Subpopulation der Leber-residenten naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen als ein potenzielles Ziel für zukünftige Immuntherapien bei immunvermittelten Lebererkrankungen in ihrer Differenzierung und Aktivierung inhibiert werden könnten. Darüber hinaus wird die Implementierung modernster Techniken in unserem Labor dazu beitragen, den Forschungsschwerpunkt Infektion und Immunität im gesamten Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf zu fördern.

### Arbeitsprogramm

**Ziel 1:** Zu testen, ob Leber-residente naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen epigenetisch prädisponiert sind, um den Polarisationszustand von T<sub>H</sub>17-Zellen zu erreichen.

Um die epigenetische Landschaft naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu visualisieren, verwenden wir 10x-Genomics-Einzelzell-ATAC-Seq (Assay für Transposase Accessible Chromatin) mit FACSsortierten naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Blut und Leber von PSC-Patienten und Kontrollen. Die Zellkerne werden isoliert, transponiert und einer GEM-Erzeugung und Barcodierung unterzogen. Hiernach erfolgt die Sequenzierung. Diese neuartige Technik ermöglicht es uns, die Chromatin-Zugänglichkeit von Promotorregionen aufzudecken und das Verständnis des Aktivierungszustands und der Funktionsfähigkeit dieser Zellen zu verbessern. Die Technik ist bereits im Labor von Nicola Gagliani etabliert, und die erforderlichen Blut- und Leberproben sind in unserer Biobank erhältlich. Bioinformatik-Analysen werden in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Stefan Bonn durchgeführt.

**Ziel 2:** Identifikation der stromalen und antigenpräsentierenden Zellen der Leber, welche die Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu T<sub>H</sub>17-Zellen begünstigen.

Um die Wechselwirkung innerhalb von Zellen in der Leber zu entschlüsseln, werden wir die neuartige 10x Genomics Visium Spatial Gene Expression Technik für Kryoschnitte von PSC-Lebern verschiedener Krankheitsstadien verwenden. Kryoschnitte von Gewebe wird auf speziell mit Barcode versehenen Objektträgern positioniert, gefolgt von H&E-Färbung und Bildgebung. Als nächstes werden die Gewebeschnitte permeabilisiert und die freigesetzte mRNA an Ort und Stelle mit Barcodes versehen. Nach der reversen Transkription und Amplifikation werden die Proben sequenziert. Die bioinformatische Interaktionsanalyse wird die Signalwege zwischen Rezeptor und Ligand aufdecken, was mittels der Visium-Ergebnisse räumlich nachvollzogen werden kann. Darüber hinaus ermöglicht die räumliche Darstellung der Genexpression die Visualisierung von Gensignaturen in nahezu Einzelzellauflösung innerhalb desselben Gewebes. Ferner kann die Rezeptor-Liganden-Interaktion nachfolgend durch In-vitro-Experimente getestet werden. Die Antragstellerin wurde hierfür bereits im Labor der Erfinder der Methode (Jonas Frisén und Joakim Lundeberg, Stockholm, Schweden)<sup>13</sup>, erfolgreich in dieser Methode geschult (Abbildung 4ad) und implementiert diese Technik derzeit im Labor von Nicola Gagliani. Bioinformatik-Analysen werden in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Stefan Bonn durchgeführt. Die für die vorgeschlagenen Experimente benötigt werden, werden in Zusammenarbeit mit Prof. Christoph Schramm von der etablierten Biobank bezogen. Wir veranschlagen für die geplanten Experimente 4 Monate. Diese werden gefolgt von einer ebenfalls 4 Monate währenden Bioinformatik-Analyse.

## Referenzen

1. Karlsen, T. H., Folseraas, T., Thorburn, D. & Vesterhus, M. Primary sclerosing cholangitis - a comprehensive review. *Journal of hepatology* **67**, 1298–1323; 10.1016/j.jhep.2017.07.022 (2017).
2. Aizarani, N. *et al.* A human liver cell atlas reveals heterogeneity and epithelial progenitors. *Nature* **572**, 199–204; 10.1038/s41586-019-1373-2 (2019).
3. Melum, E. *et al.* Genome-wide association analysis in primary sclerosing cholangitis identifies two non-HLA susceptibility loci. *Nature genetics* **43**, 17–19; 10.1038/ng.728 (2011).
4. Katt, J. *et al.* Increased T helper type 17 response to pathogen stimulation in patients with primary sclerosing cholangitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **58**, 1084–1093; 10.1002/hep.26447 (2013).
5. Sebode, M. *et al.* Reduced FOXP3(+) regulatory T cells in patients with primary sclerosing cholangitis are associated with IL2RA gene polymorphisms. *Journal of hepatology* **60**, 1010–1016; 10.1016/j.jhep.2013.12.027 (2014).
6. Nakamoto, N. *et al.* Gut pathobionts underlie intestinal barrier dysfunction and liver T helper 17 cell immune response in primary sclerosing cholangitis. *Nature microbiology* **4**, 492–503; 10.1038/s41564-018-0333-1 (2019).
7. Liwinski, T. *et al.* Alterations of the bile microbiome in primary sclerosing cholangitis. *Gut* **69**, 665–672; 10.1136/gutjnl-2019-318416 (2020).
8. Gagliani, N. *et al.* Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature*. 2015 Jul 9;523(7559):221-5. doi: 10.1038/nature14452. Epub 2015 Apr 29.
9. Brockmann, L. *et al.* Molecular and functional heterogeneity of IL-10-producing CD4+ T cells. *Nat Commun*. 2018 Dec 21;9(1):5457.
10. Kunzmann, L. K. *et al.* Monocytes as potential mediators of pathogen-induced Th17 differentiation in patients with primary sclerosing cholangitis (PSC). *Hepatology (Baltimore, Md.)*; 10.1002/hep.31140 (2020).
11. van den Broek, T., Borghans, J. A. M. & van Wijk, F. The full spectrum of human naive T cells. *Nature reviews. Immunology* **18**, 363–373; 10.1038/s41577-018-0001-y (2018).
12. Kumar, B. V., Connors, T. J. & Farber, D. L. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity* **48**, 202–213; 10.1016/j.immuni.2018.01.007 (2018).
13. Ståhl P. L. *et al.* Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science*. 2016 Jul 1;353(6294):78-82. doi: 10.1126/science.aaf2403.

**Abb. 1:** Der Einzelzellatlas intrahepatischer T-Zellen zeigt eine Population naiver CD4+ T-Zellen. **a**, Grafische Zusammenfassung des Arbeitsablaufs. **b**, Atlas von 22.196 intrahepatischen T-Zellen von Patienten mit PSC (n = 11), der 13 verschiedene Cluster zeigt. T<sub>CM</sub>, zentrale Memoryzelle; T<sub>EM</sub>, Effektormemoryzelle; T<sub>C</sub>, zytotoxischer T-Lymphozyt; T<sub>REG</sub>, regulatorische T-Zelle; T<sub>EM</sub> TH1 / TH17-state, Effektormemoryzelle mit einem TH1- und TH17-Polarisationszustand. **c**, Cluster-Heatmap, die Signaturen von differentiell exprimierten Genen (DEG) für jeden Cluster des Atlas hervorhebt (**b**). **d**, Hierarchisches Gating von naiven CD4+ T-Zellen unter Verwendung der ADT für CCR7 und CD45RA. **e**, scTCR-Seq zeigt ein hohes Verhältnis von Klonotyp zu Zelle, typisch für naive T-Zellen.

**Abb 2:** Intrahepatische naive CD4+ T-Zellen tragen einen gewebsresidenten Phänotyp und sind bei Patienten mit PSC vermehrt. **a**, UMAP-Projektion, die den Ursprung der Zellen hervorhebt. Die Punktgröße repräsentiert die Übereinstimmung mit einer Gensignatur für Gewebersidenz. **b**, Vulkanplot der DEG zwischen intrahepatischen naiven CD4+ T-Zellen aus PSC und ALD im Spätstadium, was auf eine Ähnlichkeit der Genexpression hinweist. Linien zeigen eine logarithmische Änderung des Ausdrucks an (|logFC| > 0,6). **c**, Violinplot zur Quantifizierung gemäß Residency-Score aus (a). CD4+ T<sub>EM</sub> TH1 / TH17-Zustand wurden als positive Kontrolle eingeschlossen. \*: p < 0,05; \*\*: p < 0,01; \*\*\*: p < 0,001, bestimmt durch Wilcoxon-Signed-Rank-Test. **d**, Immunhistochemische Färbung von CD4 bzw. CD45RA in einer Leber mit PSC. Gallengänge sind durch Sternchen gekennzeichnet. **e**, Häufigkeiten von intrahepatischen naiven CD4+ T-Zellen, bestimmt durch klassisches hierarchisches Gating für CCR7 und CD45RA (dargestellt als Median mit Interquartilbereich. \*: p < 0,05, wie durch den Kruskal-Wallis-Test bewertet).

**Abb 3:** Neigung von naiven CD4+ T-Zellen, sich zu Effektorzellen mit einem TH17-Polarisationszustand zu entwickeln. **a**, Diffusionskartenbasierte UMAP-Projektion von 3.568 extrahierten intrahepatischen CD4+ T-Zellen von Patienten mit PSC (n = 6), resultierend in 8 Cluster. Slingshot mit naiven CD4+ T-Zellen als Ausgangspunkt. **b**, Palantir-Analyse der Daten aus (a). Mittlere Wahrscheinlichkeit der Differenzierung naiver CD4+ T-Zellen in CD4+ -Effektor-Memoryzellen mit einem TH17-Polarisationszustand (CD4+ T<sub>EM</sub> TH17-Zustand), CD4+ Effektor-Memory (CD4+ T<sub>EM</sub>), zytotoxischen CD4+ (CD4+ T<sub>C</sub>) T-Zellen und regulatorischen T-Zellen (T<sub>REG</sub>). T<sub>REG</sub> wurden als Negativkontrolle eingeschlossen. **c**, Grafische Zusammenfassung des Arbeitsablaufs von In-vitro-Experimenten. **d, e**, In-vitro-Kultur von naiven CD4+ T-Zellen unter nicht polarisierenden Bedingungen für 7 Tage (PSC: n = 7; HD: n = 10). Die Proliferation (**d**) wurde durch Nachweis von CellTrace Violet bestimmt und die Sekretion von IL-22 (**e**) wurde durch Multiplex-ELISA analysiert. **f**, In-vitro-Kultur von naiven CD4+ T-Zellen unter TH17-polarisierenden Bedingungen für 12 Tage (PSC: n = 7; HD: n = 10). Foldchange der Frequenzen von CD4+ IL-17A+ Zellen, normalisiert auf die jeweiligen Kontrollen jedes Experiments (n = 4). Die Daten in (d, e, f) werden als Median mit Interquartilbereich dargestellt. ns: p > 0,05; \*: p < 0,05; \*\*: p < 0,01; \*\*\*: p < 0,001, wie durch den Mann-Whitney-U-Test bewertet.

**Abb 4:** Visium Spatial Transcriptomics der menschlichen Leber mit Leberzirrhose bei primär sklerosierender Cholangitis (PSC). **a**, H&E-Färbung der zirrhotischen PSC-Leber. Beachten Sie die lymphoiden Follikel (dunkelviolett) im fibrösen Bereich. **b** Sättigung der Spots mit mRNA und Barcodes, angezeigt ist die UMI-Abdeckung pro Spot **c** Differenzielle Genexpression per Spot, hervorgehoben durch

die Clusterfarbe, wie in d gezeigt. **d** tSNE-Projektion von 3.425 Spots, die 4 verschiedene Cluster bilden. Hepatozyten bilden den größten Cluster (blau), gefolgt von Stromazellen im fibrotischen Bereich (orange). Sowie zwei Cluster im Bereich der lymphoiden Aggregation (grün) und biliären Metaplasie (rot).