

Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf

I. Medizinischen Klinik und Poliklinik

des Zentrums für Innere Medizin

Klinikdirektor: Prof. Dr. Ansgar W. Lohse

**Regulatorische T-Zellen bei Erstdiagnose autoimmuner  
Lebererkrankungen – eine histologische und klinische  
Charakterisierung**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Björn Franke

aus Bremen

Hamburg 2012

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 23.11.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. C. Schramm

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: PD Dr. O. Steinmetz

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: PD Dr. J. Herkel

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>3</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>5</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>8</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>8</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>10</b>
1.1 Einführung .....	10
1.2 Regulation von Entzündung und Toleranz.....	11
1.3 Die Leber und untersuchte Immunzellen .....	12
1.3.1 Kupffer Zellen .....	13
1.3.2 Neutrophile Granulozyten.....	14
1.3.3 Natürliche-Killerzellen.....	14
1.3.4 Konventionelle T-Lymphozyten und B-Zellen.....	14
1.3.5 Unkonventionelle T-Zellen: NKT Zellen .....	15
1.4 Regulatorische T-Zellen (Tregs) .....	16
1.4.1 Tregs: Aktivierung und Ausreifung.....	17
1.4.2 Tregs: Mechanismen .....	17
1.4.3 Tregs in therapeutischen Ansätzen.....	18
1.5 Leber- und Gallenwegserkrankungen .....	19
1.5.1 Die Autoimmune Hepatitis.....	20
1.5.2 Die Primär Biliäre Zirrhose .....	21
1.5.3 Die Primär Sklerosierende Cholangitis .....	23
1.5.4 Die nicht-alkoholische Fettleberhepatitis .....	25
1.6 Regulatorische T-Zellen bei autoimmunen Erkrankungen .....	26
1.7 Fragestellung .....	27
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>29</b>
2.1 Material.....	29
2.1.1 Patienten .....	29
2.1.2 Gewebe .....	29
2.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	30
2.1.4 Chemikalien.....	31
2.1.5 Lösungen und Puffer .....	32
2.1.6 Antikörper .....	32
2.1.7 Software .....	33
2.2 Methoden.....	34
2.2.1 Immunhistochemie .....	34
2.2.2 Durchführung der immunhistochemischen Färbung.....	38
2.2.3 Auswertung.....	41

---

<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>47</b>
3.1	Patienten und klinische Parameter.....	47
3.2	Der modifizierte histologische Aktivitätsindex (mHAI).....	52
3.3	Qualitative Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen .....	53
3.4	Quantitative Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen.....	56
3.4.1	T-Zell Populationen.....	56
3.4.2	B-Zellen.....	61
3.4.3	Zellen der unspezifischen Immunantwort .....	63
3.4.4	Regulatorische T-Zellen im Vergleich zu übergeordneten Zellpopulationen.....	64
3.5	Korrelative Betrachtungen.....	66
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>68</b>
4.1	Bewertung der Immunhistochemie .....	68
4.1.1	Der Treg-Phänotyp und FoxP3 .....	68
4.1.2	Die Färbung auf CD56.....	69
4.1.3	Die Färbung auf CD4.....	70
4.1.4	Die NASH-Patienten .....	70
4.2	Ergebnisse der Patientengruppen .....	70
4.2.1	Patienten mit autoimmuner Hepatitis .....	71
4.2.2	Patienten mit Primär Biliärer Zirrhose.....	74
4.2.3	Patienten mit Primär Sklerosierender Cholangitis.....	76
4.2.4	Patienten mit nicht alkoholischer Steatohepatitis.....	78
4.3	Bewertung der histologischen Entzündungsaktivität .....	79
4.4	Bewertung der klinischen und laborchemischen Charakterisierung der Patientenkollektive.....	79
4.5	Erkenntnisse und künftige Fragestellungen .....	80
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>84</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>86</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>101</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>106</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>107</b>
	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>108</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AIH	Autoimmune Hepatitis
ALT	Alanin-Aminotransferase
AMA	antimitochondrialer Autoantikörper
ANA	antinukleäre Autoantikörper
ANOVA	engl. <i>Analysis of Variance</i> (Varianzanalyse)
APC	engl. <i>Antigen Presenting Cell</i> (antigenpräsentierende Zelle)
ASH	enlg. <i>Alcoholic Steatohepatitis</i>
AST	Aspartat-Aminotransferase
BSA	engl. <i>Bovine Serum Albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CA19-9	engl. <i>Carbohydrate Antigen 19-9</i>
CCC	engl. <i>Cholangiocellular Carcinoma</i> (Cholangioläres Karzinom)
CD	engl. <i>Cluster of Differentiation</i>
CEA	engl. <i>Carcinoembryonic Antigen</i>
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
DAB	3,3' Diaminobenzidine
DC	engl. <i>Dendritic Cells</i> (dendritische Zellen)
EAE	engl. <i>Experimental Autoimmune Encephalitis</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERC	endoskopisch retrograde Cholangiographie
etc.	lat. <i>et cetera</i> (und im übrigen)
Fa.	Firma
FACS	engl. <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FoxP3	engl. <i>Forkhead box P3</i>
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase

---

H <sub>2</sub> O dd	destilliertes Wasser
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIER	hitzeinduzierte Epitopdemaskierung
HLA	engl. <i>Human Leukocyte Antigen</i>
HRP	engl. <i>Horseradish Peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
ID	engl. <i>Identification(number)</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iTreg	induzierte regulatorische T-Zelle
IZ	intrazellulär
LKM	engl. <i>Liver Kindney Microsomes</i> (Leber-Nieren-Mikrosomen)
ln	lat. <i>Logarithmus naturalis</i> (natürlicher Logarithmus)
M.	lat. <i>Morbus</i> (Krankheit)
M2	antimitochondrialer Autoantikörper M2
mHAI	modifizierter Histologischer Aktivitätsindex
MHC	engl. <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MPO	Myeloperoxidase
MRC	Magnetresonanzcholangiographie
NAFLD	engl. <i>Non-Alcoholic Fatty Liver Disease</i>
NASH	Nichtalkoholische Steatohepatitis
No.	engl. number
nTreg	natürliche regulatorische T-Zelle
P-ANCA	engl. <i>perinuclear Anti Neutrophil Cytoplasm Antibodies</i>
Pat.	Patient(en)
PBC	Primär biliäre Zirrhose
PDC-E2	Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes
PM	plasmamembranös
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
s.u.	siehe unten

---

SEM	engl. <i>Standard Error of the Mean</i> (Standardfehler)
SLA	engl. <i>Soluble Liver Antigen</i> (lösliches Leberantigen)
SMA	engl. <i>Smooth Muscle Antigen</i> (glatte Muskulatur Antigen F-Actin)
TBS	engl. <i>Tris-buffered Saline</i>
TCR	engl. <i>T-Cell Receptor</i> (T-Zell Rezeptor)
TEC	Tris-EDTA Citrat
TGF- $\beta$	enlg. <i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math></i> (Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$ )
TNF- $\alpha$	enlg. <i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i> (Tumornekrosefaktor $\alpha$ )
Treg	regulatorische T-Zelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UDCA	engl. <i>Ursodeoxycholic Acid</i> (Ursodesoxycholsäure)
$\gamma$ -GT	$\gamma$ -Glutamyltransferase

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zellpopulationen der humanen Leber .....	13
Abbildung 2: Prinzip der Envision™ Methode (I).....	35
Abbildung 3: Prinzip der Envision™ Methode (II) .....	36
Abbildung 4: Vermessung von lobulären Lebergewebe.....	42
Abbildung 5: Vermessung von portalem Lebergewebe .....	43
Abbildung 6: Laborchemische Parameter .....	50
Abbildung 7: Bewertung nach dem mHAI-Score .....	53
Abbildung 8: Immunhistochemie: FoxP3+ Zellen.....	55
Abbildung 9: Immunhistochemie: Portalfelder in der Übersicht .....	56
Abbildung 10: Zellzahlen, portal: CD3+, CD8+, CD4+ Zellen.....	58
Abbildung 11: Zellzahlen, lobulär: CD3+, CD8+ Zellen.....	59
Abbildung 12: Zellzahl, portal: FoxP3+ Zellen.....	60
Abbildung 13: Zellzahl, lobulär: FoxP3+ Zellen.....	61
Abbildung 14: Zellzahl, portal: CD20+ Zellen.....	62
Abbildung 15: Zellzahl, lobulär: CD20+ Zellen.....	62
Abbildung 16: Zellzahlen, portal: CD163+ und MPO+ Zellen .....	64
Abbildung 17: Zellzahlen, lobulär: CD163+ und MPO+ Zellen .....	64
Abbildung 18: Verhältnis FoxP3+ Zellen zu CD3+ T-Zellen .....	65
Abbildung 19: Verhältnis FoxP3+ Zellen zu CD4+ T-Zellen im Portalfeld .....	65

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Materialien .....	30
Tabelle 2: Chemikalien.....	31
Tabelle 3: Antikörper (I).....	33
Tabelle 4: Verwendete Software.....	33
Tabelle 5: Tonsillengewebe .....	37
Tabelle 6: Antigenlokalisierung.....	37
Tabelle 7: Antigendemaskierung .....	39
Tabelle 8: Antikörper (II) .....	40
Tabelle 9: Der modifizierte histologische Aktivitätsindex (mHAI).....	44
Tabelle 10: Klinische Parameter.....	45
Tabelle 11: Übersicht: Klinische Parameter .....	49
Tabelle 12: Antikörperstatus.....	51
Tabelle 13: Bewertung nach dem mHAI-Score.....	52
Tabelle 14: Zellzahlen: CD3 und CD8 portal und lobulär und CD4 portal .....	57
Tabelle 15: Zellzahlen: FoxP3 .....	60
Tabelle 16: Zellzahlen: CD20 .....	61
Tabelle 17: Zellzahlen: CD163 und MPO .....	63
Tabelle 18: Korrelationsanalyse der FoxP3+ Tregs im Portalfeld (Lobulär).....	66
Tabelle 19: Korrelationsanalyse des mHAI im Vergleich zu den klinischen Parametern.....	67

---

Tabelle 20: Anhang - Klinik.....	101
Tabelle 21: Anhang - Labor.....	102
Tabelle 22: Anhang - mHAI (detailliert).....	103
Tabelle 23: Anhang - Zellzahlen, portal (detailliert).....	104
Tabelle 24: Anhang - Zellzahlen, lobulär (detailliert).....	105

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung

Bei immunologisch vermittelten Schäden der Leber und Gallengänge, wie man sie bei der autoimmunen Hepatitis, der primär sklerosierenden Cholangitis und der primär biliären Zirrhose findet, kommt es in der Leber zu akuten und chronischen Entzündungsprozessen. Chronische Entzündungen können in diesem Organ zu unerwünschten Ausheilungsformen wie Fibrose oder Zirrhose führen. Gefürchtete Komplikationen des chronischen Leberschadens sind unter anderem die portale Hypertension, das Leberausfallkoma oder auch die Entstehung von Lebertumoren (Böcker et al. 2008). Die Kontrollmechanismen von Entzündungsreaktion und Regeneration stehen im Mittelpunkt vieler aktueller Forschungsarbeiten. Bei den autoimmunen Hepatopathien und den einhergehenden überschießenden Immunreaktionen erhofft man sich durch das Identifizieren und Verstehen der verschiedenen Regulationsmechanismen neue therapeutische Perspektiven.

Bei verschiedenen Zellen des Immunsystems ist ein regulatorischer, häufig suppressiver, Einfluss auf Entzündungsreaktionen nachgewiesen. FoxP3 positive (FoxP3+) regulatorische T-Zellen sind bereits seit einigen Jahren als eine Subpopulation der T-Zellen identifiziert, die in der Lage ist Immunreaktionen zu unterdrücken. Ihnen wird eine zentrale Bedeutung bei der Regulation und vor allem bei der Begrenzung von Entzündungsreaktionen zugesprochen (vgl. Abschnitt *1.4 Regulatorische T-Zellen (Tregs)*). Die Forschungsergebnisse bezüglich ihrer Zahl, Lokalisation und Funktion bei autoimmunen Lebererkrankungen sind bisher nicht einheitlich. Aktuelle Daten lassen vermuten, dass Quantifizierungen im peripheren Blut und im betroffenen Lebergewebe nur eingeschränkt vergleichbar sind. Auch findet das klinische Stadium der Erkrankung in vielen der bisherigen Arbeiten nicht ausreichend Berücksichtigung.

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der Immunantwort bei der Erstdiagnose von Leber- und Gallenwegserkrankungen mit einer autoimmunen Genese, insbesondere im Hinblick auf die Population der FoxP3+ regulatorischen T-Zellen. Zusätzlich erfolgt die Erhebung der klinischen und histologischen Befunde der Patienten.

Im Abschnitt *1.2 Regulation von Entzündung und Toleranz* erfolgt eine kurze Einführung in grundlegende immunologische Konzepte. Darauf folgen in den Abschnitten *1.3 Die Leber und untersuchte Immunzellen* und *1.4 Regulatorische T-Zellen (Tregs)* eine Darstellung der in der Leber vorkommenden Immunzellen, inklusive einer ausführlichen Beschreibung der FoxP3+ regulatorischen T-Zellen. Im Anschluss werden im Abschnitt *1.5 Leber- und Gallenwegserkrankungen* die in dieser Arbeit untersuchten Erkrankungen der Leber vorgestellt. Mit einem kurzen Überblick über den aktuellen Stand zum Thema FoxP3+ Tregs, autoimmune Erkrankungen und die sich für diese Arbeit ergebenden Frage-

stellungen bilden die Abschnitte 1.6 *Regulatorische T-Zellen bei autoimmunen Erkrankungen* und 1.7 *Fragestellung* den Abschluss des ersten Kapitels.

## 1.2 Regulation von Entzündung und Toleranz

Eine unverzichtbare Fähigkeit des Immunsystems ist die Unterscheidung zwischen fremd und selbst. Um nicht jedes Antigen, beispielsweise mit einer Entzündungsreaktion, zu bekämpfen, muss das eigene oder ungefährliche Antigen toleriert werden. Die fehlerhafte Aktivierung durch eigene oder den eigenen sehr ähnlichen Antigenen spielt in der Pathogenese der Autoimmunkrankheiten eine wichtige Rolle.

Die Ausreifung der Zellen des spezifischen Immunsystems erfolgt in mehreren Stufen. Im Thymus überleben nur etwa die 2% der T-Zellen, die zur Interaktion mit körpereigenen MHC Molekülen (engl. *major histocompatibility complex*) fähig sind (positive Selektion) und deren T-Rezeptor dabei nicht gegen körpereigenes Antigen gerichtet ist (negative Selektion). Im Knochenmark erfahren B-Zellen eine ähnliche negative Selektion. Die Deletion autoreaktiver T- und B-Zellen in den primär lymphatischen Organen wird in der englischsprachigen Literatur als „*recessive tolerance*“ oder auch „*passive tolerance*“ beschrieben (Fontenot und Rudensky 2005). In den klassischen Theorien zur Entstehung von Autoimmunkrankheiten führt ein unerwünschtes Überleben autoreaktiver Zellen zur Ausbildung einer potentiell selbst-schädigenden Zellpopulation. Gershon et al. stellten bereits 1971 die Hypothese auf, dass eine spezialisierte Subpopulation der T-Lymphozyten existiert, welche in der Lage ist konventionelle Immunantworten zu beenden und den Körper vor autoimmunen Reaktionen zu schützen (Gershon und Kondo 1971). Dieses Konzept, analog zu obigem Modell „*dominant tolerance*“ oder „*active tolerance*“ genannt, wird als zweite wichtige Säule der Toleranz angesehen. Das Vorhandensein aktiver Mechanismen lässt vermuten, dass es regelmäßig zur Ausbildung von Autoaktivität kommt, welche durch körpereigene Maßnahmen begrenzt werden kann. Die Verschiebung der Immunantwort weg von einer zytotoxischen Th1-Antwort der CD4+ Zellen wird in der englischen Literatur als *immune deviation* bezeichnet und gilt, auch in der Leber (Klugewitz et al. 2002), als Schlagwort für einen zentralen Mechanismus von Toleranz. Weitere Mechanismen sind die Apoptose von aktivierten T-Zellen oder auch die, im englischen *anergy* benannte, Induktion von Funktionslosigkeit von Effektorzellen (Goubier et al. 2008; Holz et al. 2008).

Mittlerweile sind eine Reihe von Zellpopulationen identifiziert, die eine solche regulative bzw. suppressive Funktion vermitteln. Neben der wichtigsten, den im Abschnitt 1.4 *Regulatorische T-Zellen (Tregs)* gesondert dargestellten CD4+CD25<sup>high</sup>FoxP3+ regulatorischen T-Zellen (Tregs), gehören hierzu auch die ebenfalls CD4+, Tr1- und Th3-Zellen. Sie vermitteln Suppression hauptsächlich durch lösliche Zytokine wie das Interleukin 10 (IL-10) (Roncarolo und Levings 2000) und den transformierenden Wachstumsfaktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Jonuleit und Schmitt 2003; Faria und Weiner 2005). Bei natürlichen Killer T-Zellen (NKT-Zellen) sind sowohl direkte (Oh et al. 2005), als auch indirekte regulatorische Eigenschaften durch die Beeinflussung von klassischen Tregs mittels IL-2

Sekretion beschrieben (Cava et al. 2006). Weiter werden  $\gamma\delta$ -T-Zellen (Girardi 2005) und Th17-Zellen (Harrington et al. 2005) regulatorische Funktionen zugeschrieben (vgl. Abschnitt 4.5 *Erkenntnisse und künftige Fragestellungen*). Unlängst wurde eine weitere regulatorische T-Zellpopulation mit einem CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>-Phänotyp charakterisiert (Smith und Kumar 2008).

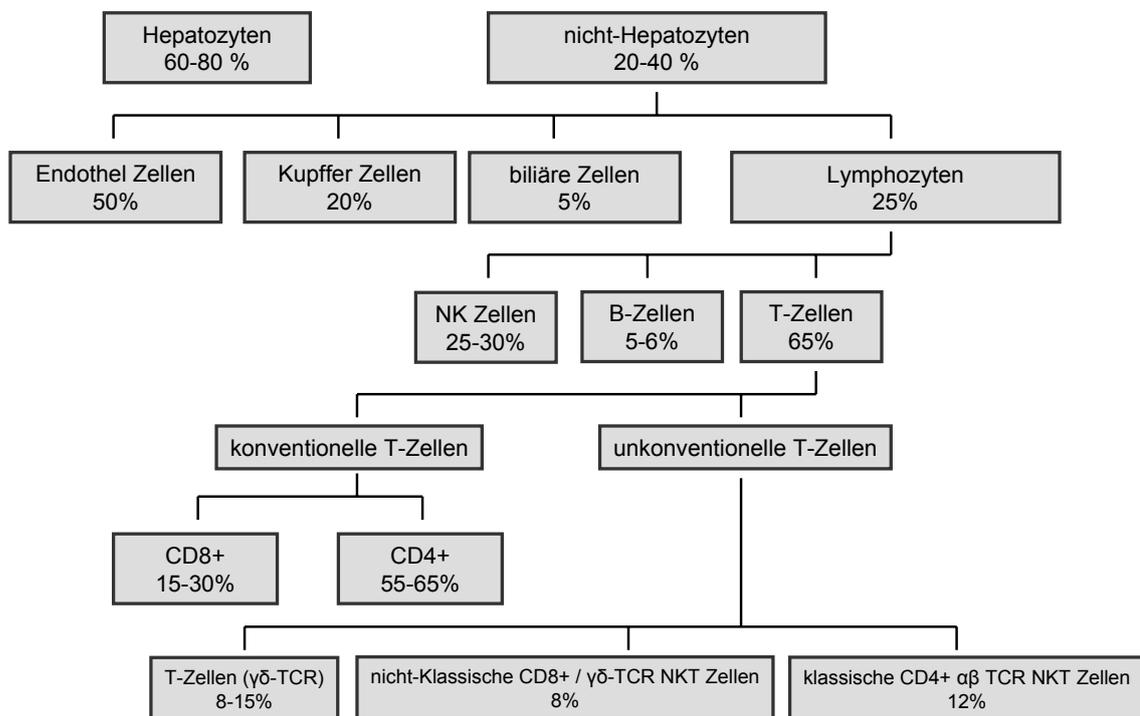
### 1.3 Die Leber und untersuchte Immunzellen

Die Leber ist das größte solide Organ des menschlichen Körpers. Durch die doppelte Blutversorgung aus Portalvene und Leberarterie ist sie mit etwa 25% des gesamten Herzzeitvolumens besonders stark durchblutet. Unter den nicht-lymphatischen Organen weist die Leber zusätzlich den höchsten Fluss an Lymphe auf (Crispe 1999). Das portalvenöse Blut stammt aus dem venösen Abfluss des Gastrointestinaltrakts und der Milz, den beiden größten soliden Organen des Immunsystems. Ein großer Teil der Fremdartigene, denen der Organismus ausgesetzt ist, wird oral aufgenommen und gelangt primär über den Pfortaderkreislauf in die Leber. Die Leber besitzt daher eine Vielzahl von Toleranzmechanismen, denn durch diese Physiologie ergibt sich, dass die Leber ständig und in hoher Zahl fremden, zumeist harmlosen Antigenen ausgesetzt ist. Gleichzeitig ist die Leber ein metabolisch sehr aktives Organ und produziert einen großen Teil der körpereigenen Proteine, die bei fehlender Toleranz potentielle Autoantigene darstellen (Tiags und Lohse 2009). Seit vielen Jahren ist bekannt, dass durch den Magen-Darm Trakt aufgenommene Fremdartigene über die Induktion verschiedener Mechanismen eine Toleranz des Immunsystems erzeugen können (Konzept der „oralen Toleranz“ (Besredka 1909)). Viele dieser Mechanismen sind in der Leber lokalisiert. Es wird vermutet, dass auch die Induktion antigenspezifischer Tregs zu Toleranz beiträgt (Faria und Weiner 2006; Erhardt et al. 2007). Wichtige Vermittler der Suppression sind inhibitorisch wirkende Zytokine wie IL-10 oder auch TGF- $\beta$ . Huber et al. haben gezeigt, dass auch in der Leber die Konversion zu CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup> Tregs abhängig ist von TGF- $\beta$  (Huber et al. 2004). Vor dem Hintergrund der Induzierbarkeit von Toleranz, zeigten Lüth et al. eine effektive Suppression im Mausmodell der Multiplen Sklerose (EAE) durch den Transfer von Tregs welche aus Tieren stammten, die in ihrer Leber das EAE Antigen MBP exprimierten (Lüth et al. 2008b).

Bei der Vermittlung von Toleranz in der Leber spielen eine Reihe von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) eine wichtige Rolle. Als Interaktionspartner der Lymphozyten gelten dabei nicht nur die klassischen APCs wie die dendritischen Zellen und Kupffer-Zellen. Auch die Endothelzellen in den Lebersinus, die LSECs (engl. *liver sinusoidal endothel cells*) (Lohse et al. 1996) und die Stern- bzw. I-to-Zellen können Antigene präsentieren. LSECs scheinen durch ihre Interaktion mit T-Zellen Toleranz zu induzieren (Knolle et al. 1999; Wiegard et al. 2005). Kupffer-Zellen präsentieren Antigene und sind ebenfalls in der Lage Toleranz zu vermitteln (Roland et al. 1993; Knolle et al. 1995). Neuere Arbeiten konnten zeigen, dass im Rahmen aktiver Entzündungen MHC II von den Hepatozyten exprimiert wird und durch die fenestrierte Basalmembran eine direkte Interaktion der Leber-

parenchymzellen mit Lymphozyten stattfindet, welche tolerogen beeinflusst werden (Herkel et al. 2003; Wiegard et al. 2007).

Ziel der immunhistochemischen Färbungen in dieser Arbeit ist die Untersuchung der Anzahl und Verteilung nicht parenchymatöser, monozytärer Zellen im Lebergewebe. In der gesunden Leber finden sich etwa  $10^{10}$  Lymphozyten. Bei den untersuchten Erkrankungen ist ein Entzündungs-infiltrat zu erwarten, welches vornehmlich lymphozytär geprägt ist (vgl. Abschnitt 1.5 *Leber- und Gallenwegserkrankungen*). Die untersuchten Zellen der unspezifischen Immunantwort und die untersuchten Populationen und Subpopulationen der Lymphozyten werden im Folgenden kurz charakterisiert. Ein Überblick über die wichtigsten Zellpopulationen der menschlichen Leber und ihre Verteilung im Gesunden zeigt Abbildung 1.



**Abbildung 1: Zellpopulationen der humanen Leber**

aus Crispe (1999), Klugewitz et al. (2004) und Racanelli (2006)

### 1.3.1 Kupffer Zellen

Nach den sinusoidalen Endothelzellen sind die Kupffer-Zellen die zweite große Zellpopulation, welche die Lebersinus auskleidet. Kupffer-Zellen der Leber machen in etwa 80% der Gewebemakrophagen des gesamten Organismus aus (Crispe 1999). Zur Darstellung der Makrophagen bzw. Kupffer-Zellen im Lebergewebe wird eine Färbung auf CD163 angefertigt - einem etablierten Marker für Makrophagen bzw. Monozyten (Zola 2007). CD163 ist ein transmembranes Glykoprotein mit bisher unklarer Funktion. Es wird vermutet, dass es eine Rolle in der anti-inflammatorischen Monozytenantwort spielt (Lau et al. 2004).

### 1.3.2 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten gehören zu den klassischen Vertretern des unspezifischen Immunsystems (Murphy et al. 2008). In den Granula neutrophiler Granulozyten findet sich eine hohe Konzentration des Enzyms Myeloperoxidase. Die Anfärbung des Enzyms ist aufgrund der Bedeutung in der Leukämiediagnostik gut etabliert. In der Leber ist MPO ein spezifischer Marker für neutrophile Granulozyten (Amanzada et al. 2011). Eine Anfärbung mit monoklonalen Antikörpern in Formalin fixiertem, Paraffin eingebetteten Gewebe führte bisher zu unbefriedigenden Ergebnissen (Arber et al. 2001), so dass in dieser Arbeit ein polyklonaler Antikörper (Fa. Dako) verwendet wird.

### 1.3.3 Natürliche-Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) stellen neben B- und T-Lymphozyten die dritte große Gruppe der Lymphozyten in der Leber dar. Sie haben hauptsächlich Effektorfunktion im Rahmen der Immunantwort (Racanelli 2006). NK-Zellen regulieren die Ausreifung von NK T-Zellen (Emoto und Kaufmann 2003) und werden ihrerseits wiederum sowohl inhibitorisch als aktivierend reguliert (Racanelli 2006). Die immunhistochemische Anfärbung der NK-Zellen mittels CD56 wird im Abschnitt *1.3.5 Unkonventionelle T-Zellen: NKT Zellen* besprochen.

### 1.3.4 Konventionelle T-Lymphozyten und B-Zellen

Im gesunden Lebergewebe machen T-Zellen etwa 65% der hepatischen Lymphozyten aus. Der überwiegende Teil der T-Zellen findet sich in den Portalfeldern. Zur Anfärbung der Gesamtpopulation der T-Zellen wird das Oberflächenmolekül CD3 dargestellt. CD3 ist Teil des T-Zell Rezeptors (TCR) und wird vornehmlich von T-Zellen exprimiert, unabhängig davon, ob ihr TCR  $\alpha\beta$ - oder  $\gamma\delta$ - Ketten ausweist. Er gilt als bester Marker für reife T-Zellen (Zola 2007). Die Subpopulation der T-Helferzellen wird durch das Anfärben des Oberflächenmolekül CD4 dargestellt. CD4 ist ein Transmembranprotein und fungiert als Korezeptor für MHC II Moleküle. Es stabilisiert die Bindung zwischen MHC II und dem TCR. Die Darstellung der zweiten großen Subpopulation der reifen T-Zellen, den zytotoxischen T-Zellen, erfolgt anhand des CD8 Moleküls, einem Transmembranprotein welches als Korezeptor für das MHC I Molekül der zytotoxischen T-Zellen fungiert (Zola 2007). Das Verhältnis von CD4+ zu CD8+ T-Zellen beträgt, ähnlich dem im peripheren Blut, in etwa 2:1. Schwankungen bis 0,5:1 sind beschrieben (Crispe 1999).

Die Darstellung der regulatorischen Subpopulation der CD4+ T-Zellen (Treg) erfolgt durch das Anfärben des Transkriptionsfaktors Forkhead box P3 (FoxP3). Im Abschnitt *1.4 Regulatorische T-Zellen (Tregs)* wird diese Zellpopulation gesondert dargestellt. Eine kritische Betrachtung des Markers FoxP3 findet sich im Abschnitt *4.1.1 Der Treg-Phänotyp und FoxP3*.

Der Anteil der B-Zellen an der Gesamtzahl der hepatischen Lymphozyten wird im gesunden Lebergewebe mit etwa 5% angegeben. Physiologisch variiert dieser Anteil stark, abhängig z.B. vom Alter oder Grad der Antigenexposition. Erkenntnisse über die Lokalisation in gesundem Lebergewebe sind rar. Ein Überwiegen der Lokalisation im Leberläppchen gegenüber den Portalfeldern ist beschrieben (Crispe 1999). Reife B-Lymphozyten besitzen auf ihrer Oberfläche das Antigen CD20. Hierbei handelt es sich um ein Phosphoprotein welches einen homo-oligomeren Komplex bildet und als Calciumkanal in der Membran fungiert. Funktionell ist dieser eng mit dem B-Zell Rezeptor (BCR) verbunden. CD20 gilt als der Standard Marker für reife B-Zellen und wird auch in der Routinediagnostik, z.B. bei Lymphomen, eingesetzt. Unreife B-Zellen oder Plasmazellen sind noch nicht bzw. nicht mehr CD20 positiv.

### 1.3.5 Unkonventionelle T-Zellen: NKT Zellen

Eine weitere T-Zell-(Sub-)Population sind Zellen, welche Eigenschaften von T-Zellen und natürlichen Killer Zellen in sich vereinigen und als NK-T-Zellen bezeichnet werden (Norris et al. 1998). Sie repräsentieren eine heterogene Subpopulation der T-Zellen und exprimieren neben dem T-Zell Marker CD3 auch Oberflächenmoleküle der natürlichen Killerzellen wie CD57 und CD56. Viele NKT-Zellen sind weder CD4- noch CD8-positiv und etwa bei etwa einem Viertel besteht der TCR nicht aus  $\alpha$  und  $\beta$  Kette, sondern sie besitzen einen  $\gamma\delta$ -TCR (Emoto und Kaufmann 2003; Swain 2008). Die klassischen NK-T-Zellen entstehen im Thymus, aber eine zweite Population scheint direkt in der Leber heranzureifen (Sato et al. 1995). Sie ist ein wichtiges Beispiel für Thymus unabhängige T-Zellen im Organismus und im Zusammenhang mit der Leber wahrscheinlich das wichtigste Beispiel für diesen Zelltyp. In der Leber findet sich in der Regel die größte Population im Organismus, NKT-Zellen machen dort zwischen 20% und 30% der hepatischen T-Zellen aus (Crispe 1999; Exley und Koziel 2004). Nach Swain et al. (2010) ist ihre Zahl bei autoimmunen Hepatopathien sogar noch weiter erhöht. Die Funktion der NK-T-Zellen ist noch nicht ausreichend verstanden. Nach ihrer Aktivierung sind sie in der Lage sich wie Killerzellen zu verhalten und andere Zellen mittels Fas-ligand, Perforin oder Granzym abzutöten. Durch ihre große Anzahl und umfangreiche Zytokinsekretion vermuten viele Autoren eine zusätzliche regulatorische Funktion, evtl. eine Steuerung in Richtung Th1- oder Th2-Antwort (Murphy et al. 2008; Swain 2008).

Um einen Überblick über die beschriebenen NK-Zell Populationen zu erhalten, soll in dieser Arbeit zunächst die Darstellung der NK-Zellen und NK-T-Zellen mittels Anfärbung des Antigens CD56, auch genannt Neural cell adhesion molecule (NCAM), erfolgen. Die Beobachtungen bei dieser Färbung werden im Abschnitt 3.3 *Qualitative Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen* aufgegriffen und im Abschnitt 4.1.2 *Die Färbung auf CD56* diskutiert.

## 1.4 Regulatorische T-Zellen (Tregs)

Die bestbeschriebene suppressive Zellpopulation ist die der CD4+CD25<sup>high</sup>-regulatorischen T-Zellen (Tregs) (Graca et al. 2005). Ihnen wird bei Autoimmunkrankheiten, Krebs, Virusinfektionen und in der Transplantationsmedizin eine elementare Rolle in der Kontrolle von Immunantworten zugesprochen (Sakaguchi et al. 2006; Shevach 2009).

Die klassischen CD4<sup>+</sup> Tregs sind in der Lage die Aktivität und Effektorfunktion von unterschiedlichen Zellpopulationen zu vermindern. Neben den CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen und CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen zählen hierzu B-Zellen, NK-Zellen, NK T-Zellen und dendritische Zellen (Sakaguchi et al. 2001; Carambia und Herkel 2009). Ihre regulatorische Funktion ist essentiell für die Aufrechterhaltung von Selbsttoleranz und für die Begrenzung von Immunantworten. Defekte oder fehlende Tregs führen in der Maus und beim Menschen zu schweren Autoimmunkrankheiten (Sakaguchi et al. 1995; Bennett et al. 2001; Brunkow et al. 2001).

Bereits 1970 beschrieben Gershon et al. die T-Zell vermittelte Suppression einer Immunantwort und vermuteten, dass hierfür eine spezielle T-Zell Subpopulation verantwortlich sei (Gershon und Kondo 1970). Im Tiermodell wiesen Sakaguchi et al. eine suppressive CD4<sup>+</sup> T-Zell Subpopulationen nach (Sakaguchi et al. 1985). Als ein wichtiger regulatorischer Mediator wurde das Zytokin Interleukin 2 (IL-2) identifiziert, welches sich auf der Zelloberfläche an den IL-2 Rezeptor (CD25) bindet. In den neunziger Jahren konnten Untersuchungen an IL-2 defizienten Mäusen, welche an schweren Autoimmunkrankheiten litten, die Verminderung einer CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-Zellpopulation bei normaler Anzahl CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen nachweisen (Schorle et al. 1991; Suri-Payer et al. 1998). *In vivo* Untersuchungen zeigten, dass der Transfer von CD25<sup>high</sup> Zellen in CD25 negativen (CD25<sup>-</sup>) Mäusen vor der Induktion von Autoimmunkrankheiten schützen kann (Sakaguchi et al. 1995; Itoh et al. 1999). In experimentellen *in vitro* assays konnten verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> suppressive Effektorfunktion auf CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen ausüben können (Takahashi et al. 1998; Thornton und Shevach 1998).

Etwa 30% der menschlichen T-Zellen sind CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, doch nur etwa 1-2% mit der höchsten CD25 Expression (CD25<sup>high</sup>) zeigen eine suppressive Funktion (Baecher-Allan et al. 2001). Während einer Infektion oder auch autoimmunen Entzündungsreaktionen findet sich eine erhöhte Expression von CD25, was eine klare Abgrenzung der regulatorischen Population mittels der Marker CD4<sup>+</sup> und CD25<sup>high</sup> erschwert. 2001 identifizierten Brunkow et al. eine Mutation im X-chromosomalen Gen des Transkriptionsfaktors *Forkhead box P3* (FoxP3) als ursächlich für die schweren autoimmunen Entzündungsreaktionen in *Scurfy* Mäusen (Brunkow et al. 2001). Im gleichen Jahr konnten Bennett et al. im Menschen eine Mutation im FoxP3 Gen bei Patienten mit dem IPEX Syndrom nachweisen, einer systemischen Autoimmunkrankheit mit multiplen Manifestationsorten (Bennett et al. 2001). 2003 beschrieben gleich mehrere Autoren den Transkriptionsfaktor FoxP3 als Schlüsselmolekül der regulatorischen T-Zellen und postulierten, dass CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-Zellen in der Peripherie und im Thymus selektiv FoxP3 exprimieren (Fontenot et al. 2003; Hori et

al. 2003; Khattri et al. 2003). Mit wachsenden Erkenntnissen über Aktivierung und Funktionsweise von regulatorischen T-Zellen wurden weitere Marker beschrieben, wie beispielsweise CTLA4 (Tang et al. 2004), CD62L+, CD45RO+, CD45RA-, und CD45RB<sub>low</sub> (Baecher-Allan et al. 2001; Dieckmann et al. 2001). Die Spezifität von FoxP3 ist nicht unumstritten (vgl. Abschnitt 4.1.1 *Der Treg-Phänotyp und FoxP3*). Dennoch gilt FoxP3 als verlässlicher Marker für regulatorische T-Zellen (Roncador et al. 2005; Sakaguchi et al. 2007) und wird regelhaft verwendet (Bates et al. 2006; Ward et al. 2007; Lapierre et al. 2010).

#### 1.4.1 Tregs: Aktivierung und Ausreifung

Die Aktivierung von Tregs erfolgt initial TCR spezifisch (Shevach 2002). Ob weitere TCR Stimulationen zur Aufrechterhaltung der Aktivität notwendig sind ist in der Literatur umstritten (Thornton und Shevach 1998; Fontenot und Rudensky 2005). Zusätzliche wichtige Signale zur Ausbildung und Aufrechterhaltung der Treg Population vermitteln Zytokine wie beispielsweise IL-2 (Malek und Bayer 2004) und TGF- $\beta$  (Chen et al. 2003).

Beim Menschen sind zwei Treg Subpopulationen beschrieben: Eine stabile Population natürlicher bzw. naiver Treg (nTreg), welche im Thymus generiert wird (Itoh et al. 1999; Walker et al. 2003) und eine zweite instabile Population von ursprünglich CD4+CD25- T-Zellen, welche in der Peripherie durch TGF- $\beta$  und IL-2 zur Konversion gebracht werden (Chen et al. 2003; Schramm et al. 2004). Sie exprimieren nach ihrer Aktivierung zu CD4+CD25<sup>high</sup> Zellen ebenfalls FoxP3 und werden induzierte Treg (iTreg) genannt (Chen et al. 2003; Liang et al. 2005; Zheng et al. 2006). Vor dem Hintergrund der Erkenntnisse hinsichtlich unterschiedlicher Subpopulationen ist es möglich, dass bereits identifizierte Aktivierungsmechanismen nur für jeweils einen Teil der Tregs gelten. Auch ist nicht geklärt, ob der Thymus oder die Peripherie als Orte vorwiegender Bildung und Reifung anzusehen sind und ob iTregs *in vivo* eine funktionale und stabile Population darstellen (Sakaguchi et al. 2007). Es ist gezeigt worden, dass adoptiv transferierte iTreg funktionell aktiv sind. Sie sind in der Lage die autoimmunen Entzündungen von FoxP3- Scurfy-Mäusen oder auch eine autoimmune Gastritis im Mausmodell zu supprimieren (DiPaolo et al. 2007; Huter et al. 2008). Neuere Arbeiten schlagen noch weitere phänotypische und funktionelle Charakterisierungen humaner Tregs vor (Sakaguchi et al. 2010). Im Modell von Miyara et al. differenzieren nTregs durch Aktivierung zu Effektor-Tregs mit besonders hoher FoxP3 Expression (Miyara et al. 2009b) (vgl. Abschnitt 4.1.1 *Der Treg-Phänotyp und FoxP3*).

#### 1.4.2 Tregs: Mechanismen

Die bisher bekannten Mechanismen regulatorischer T-Zellen können eingeteilt werden in solche, die direkt auf Zielzellen wie beispielsweise T-Zellen oder Natürliche Killer Zellen (NK-Zellen) einwirken und solche, die den Effekt auf Immunzellen indirekt über die Beeinflussung der antigen-präsentierenden Zellen vermitteln (Maloy et al. 2003). Im Sinne einer Suppression reagieren die

Zielzellen beispielsweise mit einem Arrest des Zellzyklus, Apoptose oder einer verminderten Produktion proinflammatorischer Zytokine.

Zu den direkten Mechanismen der Tregs zählt die Sekretion eines suppressiven Zytokinmuster, bestehend vor allem aus IL-10 und TGF- $\beta$  (Huber et al. 2004; Peng et al. 2004; Presser et al. 2008). *In vitro* sind direkt zytolytische Effekte mithilfe von Granzym A und B oder Perforin beschrieben (Grossman et al. 2004). Granzym B scheint bei der Vermittlung von autoimmunen Leberschäden eine wichtige Rolle zu spielen. Ferri et al. (2010) berichten bei AIH-Patienten von einer Korrelation zwischen Granzym B Leveln und biochemischen Markern des Leberschadens, wie ALT und Bilirubin. Weiter ist gezeigt worden, dass Tregs suppressive Signale im Zellkontakt vermitteln. Proteine wie Galectin-1 (Garin et al. 2007) oder das inhibitorische cytotoxische T-Zell-Antigen-4 (CTLA-4) beeinflussen T-Zellen und auch APCs (Tang et al. 2004).

Durch das Herabsetzen der Expression Co-stimulatorischer Moleküle oder Verminderung der Antigenpräsentation von APCs können Tregs die Immunantwort indirekt unterdrücken. Verschiedene Arbeiten haben dies bereits *in vitro* für dendritische Zellen von Maus und Mensch gezeigt (Serra et al. 2003; Misra et al. 2004). Die Suppression durch Tregs scheint *in vitro* überwiegend abhängig von Zellkontakt und weniger von löslichen Zytokinen zu sein (Vignali et al. 2008). In den Augen einiger Autoren fällt immunregulatorischen Zytokinen wie TGF- $\beta$ , IL-10 oder IL-35 *in vivo* eine größere Rolle zu (Tang et al. 2004; Collison et al. 2007). In wieweit die in der Regel *in vitro* identifizierten Mechanismen auch *in vivo* tatsächlich eine Rolle spielen, ist in vielen Fällen noch Gegenstand der Forschung (Sakaguchi et al. 2010). Die funktionelle Rolle der IL-10 Sekretion konnte bereits *in vivo* nachgewiesen werden (Belkaid 2007). Auch konnte *in vivo* gezeigt werden, dass eine TGF- $\beta$  Überexpression von Tregs in einem antigen-abhängigen-Asthma Mausmodell die Tiere vor Erkrankung schützt (Presser et al. 2008). Fahlen et al. zeigten, dass TGF- $\beta$  essentiell für die regulatorische Funktion der Tregs ist, dabei jedoch auch von nicht-Tregs sezerniert werden kann (Fahlén et al. 2005). Für die zytolytischen Mechanismen fehlt bisher der *in vivo* Nachweis (Shevach 2009). Fontenot et al. vermuten, dass der je nach Ort und Art der Entzündung verschiedene Effektormechanismen der Tregs eine unterschiedlich große Rolle spielen (Fontenot und Rudensky 2005).

### 1.4.3 Tregs in therapeutischen Ansätzen

Bereits in den 80er Jahren konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Kortikosteroiden die suppressive Aktivität regulatorischer Zellen in der Leber verbessert (Nouri-Aria et al. 1982). Eine optimale, nebenwirkungsarme Therapie würde spezifisch das Ungleichgewicht in der Immunregulation wiederherstellen und autoreaktive Zellpopulationen gezielt unterdrücken. Durch körpereigene Mechanismen, wie die gezielte Aktivierung bzw. Inaktivierung spezifischer Tregs könnte dies ermöglicht werden. Durch den Transfer von Tregs ist in verschiedenen Tiermodellen die Ausbildung von Autoimmunkrankheiten verhindert worden. In Mausmodellen des Diabetes mellitus und der Colitis ulcerosa sind durch den Transfer von polyklonalen Tregs der Krankheitsausbruch bzw. die Pro-

gression verhindert worden (Sarween et al. 2004; Uhlig et al. 2006). Huang et al. konnten durch die Stimulation mittels IL-10 geprimten dendritischen Zellen eine suppressive Population FoxP3+ Tregs in einem Asthma Modell erzeugen (Huang et al. 2010). In der Regel erwiesen sich in den Transferexperimenten antigen-spezifische Tregs als effektiver und potenter, als polyklonale Treg Populationen (Stephens et al. 2009). Auch am Menschen zeigen Transferexperimente zumindest in den akuten und subakuten Phasen der Entzündung erste viel versprechende Resultate (Trzonkowski et al. 2009). Die im Abschnitt 1.3 *Die Leber und untersuchte Immunzellen* erläuterten Ansätze in der Induzierbarkeit von Toleranz durch Antigenpräsentation in der Leber werden auch im Falle der autoimmunen Lebererkrankungen weiter verfolgt. In einer Arbeit aus dem Jahr 2010 beschreiben Longhi et al. *in vitro* eine effektive Suppression von Effektor T-Zell in einer gemeinsamen Kokultur von CYP2D6-beladenen DCs (engl. *Dendritic Cells*) und CYP2D6 geprimeten Tregs. CYP2D6 ist das seit längerem bekannte Autoantigen der AIH Typ 2 (Longhi et al. 2010a). Es ist bisher allerdings nicht gelungen *in vivo* eine stabile und spezifische Treg Population zu generieren und aufrecht zu erhalten. Dennoch bieten oben beschriebene Ansätze eine interessante Perspektive für künftige Immuntherapien.

Trotz erster Erfolge therapeutischer Ansätze ist die Diskussion über die Rolle und grundlegende Mechanismen regulatorischer T-Zellen nicht beendet. Die Ausführungen in den Abschnitten 1.4 *Regulatorische T-Zellen (Tregs)* und 1.6 *Regulatorische T-Zellen bei autoimmunen Erkrankungen* zeigen, dass es weiterhin eine Reihe unbeantworteter Fragen gibt. Durch die Identifikation von Mechanismen und Interaktionen mit anderen Zellen des Immunsystems erhofft man sich ein besseres Verständnis von Entzündungsprozessen und der spezifischen Rolle des Immunsystems bei verschiedenen Erkrankungen.

## 1.5 Leber- und Gallenwegserkrankungen

Häufigste Ursache einer Entzündung der Leber sind virale Erreger oder ein toxischer Schaden. Bei einem kleineren Teil der Patienten mit einer akuten oder chronischen Entzündung der Leber oder Gallenwege beruht diese auf einem immunologisch vermittelten Leberschaden, bei dem ursächlich eine autoimmune Genese vermutet wird. Zu diesen Krankheiten zählen die Autoimmune Hepatitis (AIH), die Primär biliären Zirrhose (PBC) und die Primär skleoridierende Cholangitis (PSC). Eine spezifische Therapie für diese Erkrankungen ist bisher nicht bekannt, in einigen Fällen kann die Progression durch unspezifische Immunsuppression abgeschwächt werden. Fortschritte im Verständnis der Erkrankungen und in der Therapie haben die Prognose in den letzten Jahrzehnten erheblich verbessert. Dennoch leiden ca. 15% der Patienten, bei denen eine Lebertransplantation durchgeführt werden muss, an einer autoimmunen Lebererkrankung (Weismüller et al. 2011; Fischer et al. 2012; Nensi und Chandok 2012).

### 1.5.1 Die Autoimmune Hepatitis

Die autoimmune Hepatitis verläuft häufig schubweise und präsentiert sich mit dem Bild einer chronischen Leberentzündung. In Nordeuropa wird eine Prävalenz von 5 bis 10 Betroffenen pro 100.000 Einwohnern beobachtet (Manns et al. 2010). Die Erkrankung tritt in allen Altersgruppen auf und betrifft Frauen drei bis viermal häufiger als Männer (Czaja 1984). Für eine genetische Prädisposition spricht, dass Patienten mit bestimmten HLA Background (HLA B8, DR3 und DR4) häufiger erkranken (Donaldson et al. 1994; Lohse et al. 2009) und dass AIH-Patienten überzufällig häufig von mindestens einer weiteren Autoimmunkrankheit betroffen sind (Manns et al. 2010; Lohse und Mieli-Vergani 2011). Die genaue Ätiologie der AIH ist noch nicht vollständig verstanden. Einige Autoren vermuten, dass schädigenden CD4+ oder CD8+ Effektorzellen durch bestimmte Leberantigene geprimt und aktiviert werden und anschließend proliferieren (Ma et al. 2006; Longhi et al. 2007; Czaja und Manns 2010). Eine weitere Hypothese besagt, dass Stimuli wie beispielsweise eine Infektion mit Hepatitis A oder dem Ebbstein Barr Virus zu einem Zusammenbruch der hepatischen Toleranz führen. Das hohe Vorkommen körpereigener und fremder Antigene könnte dann eine überschießende Immunantwort auslösen (vgl. Abschnitt 1.3 *Die Leber und untersuchte Immunzellen*).

Patienten mit einer AIH klagten über unspezifische Symptome wie Juckreiz, Müdigkeit, Athralgien oder Abgeschlagenheit (Schramm et al. 2001; Riemann und Adam 2008). Ein kürzlich vorgeschlagener Diagnose-Score der „International Autoimmune Hepatitis Group“ beinhaltet vier häufig assoziierte Befunde von AIH-Patienten. Hierzu zählen die IgG-Erhöhung (Hypergammaglobulinämie), der Ausschluss einer Virushepatitis, die typische Leberhistologie und der Nachweis typischer Autoantikörper. Ein klinisches Ansprechen auf immunsuppressive Therapie bestätigt die Diagnose.

Bei ca. 80% der AIH-Patienten können erhöhte Antikörpertiter nachgewiesen werden. Es werden bis zu drei Subtypen der AIH unterschieden. 70% der AIH-Patienten leiden an der häufigsten Form, einer Typ 1 AIH, und haben erhöhte Antikörper gegen das nukleäre Antigen (ANA) oder gegen Antigene von glatten Muskelzellen (*engl.* „smooth muscle antigen“, SMA) (Krawitt 2006; Riemann und Adam 2008). Die Patienten mit einer AIH Typ 2 sind oftmals im Kindes- oder Jugendalter und positiv auf LKM Antikörper (Antikörper gegen Mikrosomen aus der Leber und Niere; *engl.* Liver Kidney Microsomes) getestet. Nur 1-3% aller AIH-Patienten fallen in diese Gruppe. Klinisch identisch zum Typ 1 unterscheiden sich ca. 20% der Patienten durch den Nachweis von Antikörpern gegen lösliches Leberantigen SLA (*engl.* „soluble liver antigen“) (Manns et al. 1987) und werden von einigen Autoren einem eigenen Subtyp, der AIH Typ 3 zugeordnet (Kanzler et al. 1999; Lüth et al. 2009).

Die Leberhistologie spielt in der Diagnostik eine wichtige Rolle (Alvarez et al. 1999). Histologisch charakteristisch, aber nicht spezifisch für die AIH sind eine periportale und portale „Interface Hepatitis“, der Nachweis von Lymphozyten- und Plasmazellinfiltraten und so genannte Mottenfraße-

nekrosen der Hepatozyten (Krawitt 2006). Zur besseren Objektivierung sind verschiedene Scores zur Beurteilung der Entzündungsaktivität und des Fibrosegrades entwickelt worden. In der Praxis finden der Metavir Score oder der in dieser Arbeit verwendete histologische Aktivitätsindex nach Ishak et al. (Ishak und Zimmerman 1995) regelhafte Anwendung zur Bewertung der Entzündungsaktivität, vgl. Abschnitt 2.2.3.2 *Pathologisches Grading*.

Unbehandelt liegt die Letalität einer autoimmunen Hepatitis um die 50% (De Groote et al. 1978). Bei rechtzeitiger Diagnose und optimaler immunsuppressiver Therapie haben die Patienten heute häufig eine annähernd normale Lebenserwartung (Kanzler et al. 2001). Eine deutlich schlechtere Prognose und höhere Komplikationsraten zeigen Patienten bei denen bei Erstdiagnose bereits eine ausgeprägte Zirrhose vorliegt (Lohse und Mieli-Vergani 2011). Medikamente der ersten Wahl sind zur Remissionsinduktion Prednisolon und zur Remissionserhaltung Azathioprin (Riemann und Adam 2008; Lohse et al. 2009). Die Normalisierung der Transaminasen und des IgGs kann als Zeichen der Remission gewertet werden (Lüth et al. 2008a). Durch den sehr variablen Verlauf ist die Therapieentscheidung häufig individuell zu treffen (Czaja 2010). Viele Patienten können mit adäquater Therapie ihr Leben lang in Remission gehalten werden. Bei ungünstigem Verlauf wird bei einem kleinen Teil der AIH-Patienten eine Lebertransplantation nötig. Die Prognosen nach Transplantation ist mit einer 10 Jahres Überlebensrate um die 75% relativ gut (Sanchez-Urdazpal et al. 1992; Reich et al. 2000; Schramm et al. 2010), allerdings kommt es bei ca. 42% der transplantierten Patienten zu einem erneuten Auftreten einer AIH (Duclos-Vallée et al. 2003).

Bei 10-20% der AIH-Patienten finden sich im Laufe der Erkrankung Merkmale (z.B. Antikörper oder histologische Charakteristika) anderer autoimmuner Lebererkrankungen wie der PBC oder PSC (Lohse et al. 2009; Lüth et al. 2009). Man spricht in diesen Fällen vom so genannten „Overlap-Syndrom“. Bei Überlappungen von AIH und PBC ist die Prognose, durch das häufig weiter gute Ansprechen auf die immunsuppressive Therapie, zufrieden stellend (Lüth et al. 2009). Für die Prävalenz und vermutlich schlechtere Prognose des „AIH-PSC-Overlap-Syndroms“ liegen nur wenige Untersuchungen vor.

## 1.5.2 Die Primär Biliäre Zirrhose

Bei der primär biliären Zirrhose kommt es zu einer aseptischen Entzündung und Destruktion der mittleren und kleinen interlobulären Gallengänge. Häufig unerkannt entwickeln die Patienten zuerst eine Cholestase mit histologisch zunehmender Leberfibrose und der möglichen Komplikation des zirrhotischen Leberversagens. Die Erkrankung zeigt in ihrer Prävalenz starke geografische Unterschiede und wird mit etwa 4 bis 40 Fällen pro 100.000 Einwohner angegeben (Kaplan und Gershwin 2005; Gross und Odin 2008). Ein Altersgipfel der Neuerkrankungen liegt um das 50. Lebensjahr. Frauen sind bis zu 10-mal häufiger betroffen als Männer (Crosignani et al. 2008).

Die genaue Pathophysiologie der PBC ist in weiten Teilen unverstanden. Für eine genetische Prädisposition sprechen familiäre Häufungen und eine Konkordanzrate bei monozygoten Zwillingen

um die 60% (Selmi et al. 2004). Weiter wird die Beteiligung eines so genannten molekularen Mimikries nach stattgehabter bakterieller Infektion an der Krankheitsursache diskutiert (Selmi und Gershwin 2004). Eine Arbeit von Mao et al. liefert Hinweise auf ein Priming durch Strukturen, die in der natürlichen und synthetischen Umwelt vorkommenden und in einigen Domänen dem Epitop der bekannten Autoantikörper gegen mitochondriale Antigene (AMA) sehr ähnlich sind (Mao et al. 2004).

Ein laborchemischer Befund mit erhöhten Cholestaseparametern wie der alkalischen Phosphatase (AP) und der  $\gamma$ -Glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT) bei anfangs oftmals normwertigem Bilirubin ist typisch. Außerdem findet sich häufig eine Erhöhung der Immunglobuline vom IgM Typ und eine Hypercholesterinämie (Mutimer et al. 1989; Riemann und Adam 2008). Bei ca. 95% der Patienten finden sich AMA Antikörper. Weitere Autoantikörper, wie beispielsweise ANA kommen ebenfalls vor. Etwa 53% der Patienten leiden zudem unter mindestens einer weiteren Autoimmunerkrankung wie beispielsweise einer Autoimmunthyreoiditis oder dem Sicca-Syndrom (Watt et al. 2004). Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt erwähnt, existieren Überlappungsformen mit der Autoimmunhepatitis.

Sind die AMA Antikörper gegen einen bestimmten Teil des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes gerichtet (PDC-E2), sind sie spezifisch für die PBC (Hirschfield und Heathcote 2008; Lüth et al. 2009). Das PDC-E2 Antigen ist auch als Zielantigen von CD4+ und CD8+ T-Zellen identifiziert worden, die im Rahmen der Erkrankung in die Leber einwandern (Kita et al. 2002). Die Kombination von Autoantikörpern (AMA) und dem Auftreten autoreaktiver T- und B-Zellen spricht für die Einordnung der PBC als autoimmune Erkrankung (Ichiki et al. 2004).

Histologisch führen diese monozytären Infiltrate zu einer progressiven und irreversiblen Gallengangsdestruktion. Gallengangsproliferate und nicht-verkäsende Granulome werden beobachtet (Ludwig 2000). Als Folge der chronischen Entzündung nimmt die Fibrogenese in der Leber zu. In der pathologischen Beurteilung werden regelhaft Fibrosescores und eine vierstufige Stadieneinteilung nach Ludwig bzw. Scheuer verwendet (Scheuer 1967; Ludwig et al. 1978). Während im Stadium 1 die Entzündung auf die Portalfelder begrenzt ist, geht sie im Stadium 2 schon über diese hinaus (so genannte Interface-Hepatitis), bildet im Stadium 3 bindegewebige Brücken zwischen benachbarten Portalfeldern und mündet schließlich im Stadium 4 in einer Zirrhose.

Heute werden die Patienten häufig bereits im präklinischen Stadium erkannt (Leuschner 2003). Der Krankheitsverlauf einer PBC ist sehr variabel. Die Therapie der Wahl mit Ursodesoxycholsäure (UDCA) führt zu einer Senkung von Bilirubin, Cholesterol und IgM und ist, bei rechtzeitiger Gabe, in der Lage die Progression der Erkrankung zu bremsen (Heathcote et al. 1994; Kaplan und Gershwin 2005). In weit fortgeschrittenen Erkrankungsstadien ist dieser Effekt nicht mehr zu beobachten (Corpechot et al. 2005). Aktuell wird der Nutzen von UDCA erneut durch die Ergebnisse einer umfangreichen Metaanalyse in Frage gestellt (Gong et al. 2008). Oft stellt die Lebertransplantation die einzig verbleibende Therapieoption dar. Die Prognose nach Lebertransplantation ist mit

einer 15-Jahres Überlebensrate von ca. 83% gut (Jacob et al. 2008). Innerhalb von 10 Jahren, entwickelt ungefähr ein Drittel der Patienten ein Rezidiv der PBC (Neuberger 2003).

### 1.5.3 Die Primär Sklerosierende Cholangitis

Die Primär sklerosierende Cholangitis ist gekennzeichnet durch Sklerose und Entzündung der mittleren und großen intra- und extrahepatischen Gallengänge. Typisch ist das makro- und mikroskopische Auftreten von Strikturen mit konsekutiver Cholestase.

Die Prävalenz beträgt in westlichen Industrieländern ungefähr 1-2:10.000 Einwohner (Bambha et al. 2003; Weismüller et al. 2008). Im Gegensatz zur AIH und PBC sind von der PSC Männer doppelt so häufig betroffen wie Frauen (Weismüller et al. 2008). Das Manifestationsalter liegt bei 25 - 45 Jahren, doch auch eine stark entzündlich Form im Kindesalter ist beschrieben (Gregorio et al. 2001). Besonders auffallend ist eine hohe Assoziation der PSC mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CEDs), wie dem Morbus Crohn oder der Colitis ulcerosa. Etwa 60-80% aller PSC-Patienten haben eine zusätzliche Darmerkrankung (Chapman et al. 1980). Umgekehrt haben ca. 5% aller Kolitis-Patienten eine PSC.

Die Ätiologie und genaue Pathogenese ist auch bei der PSC noch nicht ausreichend verstanden. Kontroverser als bei AIH und PBC wird bei der PSC diskutiert, ob die Erkrankung eine echte Autoimmunkrankheit darstellt, oder ob eine andere Ätiologie sekundär zu den bekannten immunologischen Reaktion führt (Schramm und Lohse 2005). Der PSC fehlen typische Merkmale wie ein Ansprechen auf immunsuppressive Therapie oder eine Häufung des weiblichen Geschlechts. Andere Befunde hingegen lassen eine mögliche Immunpathogenese vermuten. Es sind z.B. Autoantikörper gegen biliäre Epithelzellen gefunden worden. Weiter ist in der Gruppe der PSC-Patienten eine Häufung der typischen „autoimmunen“ HLA-Haplotypen aufgefallen (Riemann und Adam 2008; Bowlus 2010). Histologisch und experimentell sind portale Lymphozyteninfiltrate, sowie eine Lymphozytenaktivierung mit Verschiebung der Zytokinexpression in Richtung einer Th1-Antwort nachgewiesen. Eine aktuelle Hypothese besagt, dass im Darm aktivierte T-Zellen als Gedächtniszellen persistieren und auf die hepatische Expression eines darmspezifischen Chemokins (CCL25) reagieren (Grant et al. 2002b; Eksteen et al. 2004). Dies würde auch den engen Zusammenhang zwischen den CEDs und der PSC erklären. Andere Autoren wiederum sehen in der Aktivierung zytotoxischer T-Zellen die primäre Reaktion auf eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch Bakterien oder deren Bestandteile in den Gallenwegen (O'Mahony und Vierling 2006).

Klinik, Autoantikörper und auch die Leberhistologie sind oft wenig spezifisch für die Diagnose einer PSC (Angulo et al. 2000). Laborchemisch finden sich oftmals erhöhte Werte der alkalischen Phosphatase sowie eine ALT-führende Transaminasenerhöhung. Immunglobuline vom IgM und IgG Typ kommen regelhaft vor (Boberg et al. 1996) und auch assoziierte Antikörpererhöhungen, z.B. von atypischen perinukleären Antikörpern (pANCA) oder ANA und SMA-Antikörpern, sind beschrieben. Da die typischen Strikturen oft sogar makroskopisch erkennbar sind, stellt die Bildge-

bung der Gallenwege einen wichtigen Bestandteil bei der Diagnosefindung ist dar. Der bisherige Goldstandard, die endoskopisch retrograde Cholangiographie (ERC) wird zunehmend häufiger, aufgrund vergleichbarer Ergebnisse, durch die nicht invasive Magnetresonanztomographie (MRC) ersetzt (Dave et al. 2010).

Mikroskopisch findet man im Lebergewebe typischerweise ein periportales, entzündliches Ödem. Das histologische Pendant der Strikturen sind zwiebelschalenartige, konzentrische Fibrosen, welche zum Verschluss der Gallengänge führen. Die Gallengänge werden daraufhin narbig zerstört und es kommt zur Ausbildung von so genannten Mottenfraßnekrosen. Ähnlich wie bei der PBC wird durch Bildung von Bindegewebssepten allmählich der zirrhotische Umbau der Leber eingeleitet (Chapman et al. 1980; Ludwig et al. 1981). Die bereits im Abschnitt 1.5.2 *Die Primär Biliäre Zirrhose* erläuterte histologische Stadieneinteilung nach Ludwig wird auch zur Klassifikation der Schwere einer PSC verwendet, allerdings wird nur bei einem Drittel der Patienten eine typische Histologie gefunden (Chapman et al. 1980). Zeigt sich eine PSC-typische Histologie ohne den makroskopischen Strikturnachweis spricht man von einer „Small-duct-PSC“, diese wird aktuell als eigene Entität mit günstigerer Prognose diskutiert (Björnsson et al. 2008).

Eine häufige und gefürchtete Komplikation ist das cholangiozelluläre Karzinom bzw. bei gleichzeitig bestehender Kolitis auch das erhöhte Risiko für ein Colonkarzinom. Regelmäßige Kontrolluntersuchungen sind daher obligat. Ein kombiniertes Screening auf CA19-9 und CEA wird diskutiert (Ramage et al. 1995).

Trotz der vermuteten autoimmunen Genese der Erkrankung sind bisher alle Versuche einer immunsuppressiven Therapie (unter anderem Methotrexat, Ciclosporin A, Azathioprin) erfolglos geblieben. Auch für die lange empfohlene Behandlung mit UDCA ist in großen Studien bisher keinen entscheidenden Vorteil gezeigt worden (Lindor 1997; Olsson et al. 2005). Die Behandlung ist daher oftmals symptomatisch, wie beispielsweise die des bei Ikterus häufig auftretenden Juckreizes. Regelmäßige Untersuchungen sollen helfen Komplikationen frühzeitig zu erkennen. Verdächtige Stenosen können beispielsweise mittels Bürstenzytologien histologisch untersucht werden oder verengte Gallenwege werden mithilfe von Stents erweitert.

Die Prognose der Erkrankung wird bestimmt durch die unterschiedlich schnelle Progression zur Zirrhose, sowie das Auftreten einer der oben genannten malignen Neoplasien (Schramm und Galle 2005). Als ultima Ratio kommt für die PSC-Patienten ohne Kontraindikation eine Lebertransplantation in Frage. Im Mittel beträgt die Überlebenszeit bzw. Zeit bis zur Lebertransplantation nach der Erstdiagnose zwischen 12 und 17 Jahren (LaRusso et al. 2006). Nach Lebertransplantation sind die Ergebnisse weniger gut als beispielsweise bei PBC-Patienten, die 5-Jahres Überlebensrate liegt bei etwa 85% (Tischendorf et al. 2008) und auch die Reimplantationsrate ist höher als bei PBC. Das Rezidivrisiko beträgt etwa 25% (Graziadei et al. 1999).

### 1.5.4 Die nicht-alkoholische Fettleberhepatitis

Die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) ist die entzündliche Komplikation des übergeordneten Krankheitsbildes der nicht alkoholischen Fettlebererkrankungen.

Die Entität der NASH wurde erstmals von Ludwig et al. beschrieben. Sie ist charakterisiert durch das histologische Bild einer Alkoholhepatitis (ASH) ohne anamnestischen regelmäßigen Alkoholkonsum und durch enge Assoziation mit dem metabolischen Syndrom (Ludwig et al. 1980). Die Prävalenz der nicht alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) betrifft in Europa und Japan etwa 14-21% der Einwohner (Nomura et al. 1988; Bellentani et al. 1994). Neueste Daten an einer großen nordamerikanischen Kohorte sprechen sogar durchschnittlich von ca. 46% mit starken Unterschieden in den verschiedenen Bevölkerungsgruppen (beispielsweise hispanisch 58,3%, afroamerikanisch 35,1%) (Williams et al. 2011). Die NAFLD ist in den Industrienationen mittlerweile die häufigste Ursache einer Transaminasenerhöhung (Clark et al. 2003). In weniger als 10% kommt es bei einer diagnostizierten Fettlebererkrankung zur Entwicklung einer NASH (Teli et al. 1995). Hat die Entzündung allerdings erst einmal begonnen, entwickeln 10-30% der NASH-Patienten eine Fibrose oder Zirrhose mit nachweislich erhöhtem Risiko zur Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) (Ratziu et al. 2002). Der multifaktorielle Pathomechanismus aus Lipidakkumulation und dem daraus resultierenden oxidativen Stress, sowie die erhöhte Vulnerabilität der Leber gegenüber Endotoxinen sind mittlerweile gut verstanden (Day und James 1998; Chitturi und Farrell 2001). Eine autoimmune Ursache wird bei dieser Erkrankung nicht angenommen.

Laborchemisch zeigen sich regelmäßig erhöhte  $\gamma$ -GT Werte, erhöhte Transaminasen mit führender ALT und gelegentlich Erhöhungen der alkalischen Phosphatase. Auch positive Titer von antinukleären Antikörpern (ANA) finden sich bei einem Teil der Patienten. Die Diagnose bleibt mangels spezifischer Charakteristika eine Ausschlussdiagnose. Wichtige und abzugrenzende Differentialdiagnosen sind beispielsweise der medikamentös-toxische Leberschaden, eine Virushepatitis oder Stoffwechselerkrankungen wie M. Wilson.

Histologisch zeigen sich, wie bei der ASH, eine makrovesikuläre Verfettung und ein, vornehmlich lobuläres, entzündliches Infiltrat aus mononukleären Zellen und neutrophilen Granulozyten. Häufig sind weiter Mallory-Körperchen, perisinusoidale Entzündungen, zunehmende Fibrose und ballonierte, nekrotische Hepatozyten nachweisbar (Diehl et al. 1988). Brunt et al. (1999) haben ein umfangreiches System zum Grading und Staging der NAFLD bzw. NASH entwickelt, welches den Grad der Verfettung und die histologischen entzündlichen und fibrosierenden Veränderungen mit einbezieht

Eine etablierte, organspezifische Therapie für die NASH existiert bis heute nicht. Verschiedene Ansätze, beispielsweise mit Metformin, Vitamin C und E oder Ursodesoxycholsäure erwiesen sich zunächst nicht als erfolgreiche Therapieoption (Harrison et al. 2003; Lindor et al. 2004; Nair et al. 2004; Ratziu et al. 2008). In einer aktuellen, randomisierten Studie zur NASH (PIVENS Studie) konnte unter Gabe von Pioglitazone (Vitamin E) eine deutliche Verbesserung der Leberhistologie

gezeigt werden (Sanyal et al. 2010). Langfristige Ergebnisse zu diesem hoffnungsvollen Therapieansatz stehen bisher noch aus. Konventionell steht bisher die Behandlung des metabolischen Syndroms im Vordergrund. Eine optimale Diabetes-Einstellung, Gewichtsreduktion und der Abbau weiterer Risikofaktoren sollen die Progression der NAFLD zur NASH verhindern. Ist es zur Ausbildung einer NASH gekommen, stehen das rechtzeitige erkennen und behandeln von Komplikationen wie der Leberzirrhose und des HCCs im Vordergrund. Auch bei diesem Krankheitsbild stellt die Lebertransplantation oftmals die letzte verbleibende Option dar (Ong et al. 2001). Durch die oftmals weiter bestehenden Risikofaktoren, ist nach Lebertransplantationen häufig ein Rezidiv der NASH zu beobachten (Kim et al. 1996).

## 1.6 Regulatorische T-Zellen bei autoimmunen Erkrankungen

Eine unerwünscht gesteigerte Suppression von Effektorzellen wird, insbesondere in der Leber, für die Erregerpersistenz bei chronischen Virusinfektionen oder die verminderte Abwehrreaktion bei Tumorerkrankungen verantwortlich gemacht. Einige Autoren sehen als Ursache dafür eine Überaktivität regulatorischer Zellen (Bolacchi et al. 2006; Yang et al. 2006). Auf der anderen Seite kann eine ineffektive Suppression von Entzündungsreaktionen im Fall von Autoimmunerkrankheiten dazu führen, dass eine Entzündungsreaktion nicht ausreichend eingedämmt wird. Fehlfunktionen sowohl auf der Seite der Effektorzellen, als auch unter den regulatorischen Zellen werden diskutiert. Eine verminderte Aktivität bzw. funktionelle Defekte regulatorischer Zellen gehen häufig mit unzureichender Suppression von Entzündungsreaktionen einher und sind bei einer Reihe von Autoimmunerkrankheiten nachgewiesen (Cao et al. 2003; Crispin et al. 2003; Furuno et al. 2004; Viglietta et al. 2004; Lan et al. 2005).

Die Rolle regulatorischer T-Zellen bei autoimmunen Lebererkrankungen ist noch nicht vollständig verstanden. Aktuelle Untersuchungen am Menschen zeichnen ein uneinheitliches Bild von Anzahl, Verteilung und Funktion der Tregs. Einige Autoren postulieren, dass der Verlust der immunologischen Toleranz in der Leber von Patienten mit autoimmunen Lebererkrankungen mit einer Verringerung in der Anzahl regulatorischer T-Zellen einhergeht. Vor allem in FACS Analysen aus dem peripheren Blut ist dies bei Patienten mit AIH (Longhi et al. 2004; Ferri et al. 2010) und PBC (Lan et al. 2006; Wang et al. 2010) gezeigt worden. Bei bösartigen Lebertumoren oder chronischen Virusinfektion, wie beispielsweise Hepatitis C, haben einige Arbeitsgruppen hingegen eine erhöhte Anzahl regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut beschrieben (Cabrera et al. 2004; Bolacchi et al. 2006; Yang et al. 2006). Neben dem numerischen Defizit vermuten einige Autoren auch einen funktionellen Defekt als ursächlich für die unzureichende Suppression von Entzündung. Longhi et al. beschreiben ein solches Defizit bei Patienten mit AIH (Longhi et al. 2006).

Im Gegensatz zu Untersuchungen von Tregs im peripheren Blut widersprechen eine Reihe von Veröffentlichungen der letzten Jahre mit Ergebnissen aus den betroffenen Geweben der Hypothese des numerischen Defizits. So zeigten Marazuela et al. (2006), dass sich bei Patienten mit einer auto-

immunen Schilddrüsenerkrankung eine erhöhte Anzahl FoxP3+ Tregs sowohl im peripheren Blut, als auch im Schilddrüseninfiltrat befindet. Cao et al. (2006) berichteten von einer erhöhten Anzahl FoxP3+ Tregs in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis. Auch Untersuchungen am Lebergewebe von Patienten mit AIH (Sakaki et al. 2008; Koyabu et al. 2010) und PBC (Sasaki et al. 2007; Koyabu et al. 2010) fanden eine erhöhte Anzahl regulatorischer T-Zellen. Die größten Schwierigkeiten beim Vergleich quantitativer Arbeiten bereiten die methodisch nicht einheitliche Auswertung und die klinische Heterogenität der Patienten. Eine ausführliche Darstellung aktueller Arbeiten erfolgt gemeinsam mit einer Diskussion der eigenen Ergebnisse im Kapitel 4 dieser Arbeit.

## 1.7 Fragestellung

In dieser Arbeit soll das Immunzellinfiltrat verschiedener Hepatopathien, bei denen eine autoimmune Genese vermutet wird untersucht werden. Insbesondere die Anzahl und Verteilung regulatorischer T-Zellen (Tregs) in verschiedenen Patientengruppen soll Aufschluss über mögliche pathophysiologische Zusammenhänge geben und die Hypothese des numerischen Defizits überprüfen. Um die gewonnen Erkenntnisse in einen klinischen Kontext einzuordnen, werden alle Untersuchungen zu einem ähnlichen Zeitpunkt der Erkrankung, nämlich dem Zeitpunkt der Erstdiagnose, durchgeführt. Es werden Gewebeproben von Patienten untersucht, die zum Zeitpunkt der Erstdiagnose einer Autoimmunen Hepatitis (AIH), Primär biliären Sklerose (PBC) oder Primär skleorisierenden Cholangitis (PSC) entnommen worden sind. Um den Vergleich mit einer nicht autoimmun bedingten Hepatopathie zu ermöglichen, erfolgen sämtliche Untersuchungen und Erhebungen auch an einer Patientengruppe mit der Erstdiagnose einer nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH). Der Pathomechanismus der NASH ist ausreichend gut verstanden, um die Erkrankung in dieser Arbeit als Beispiel einer Hepatitis ohne autoimmune Genese zu betrachten (vgl. Abschnitt 1.5.4 *Die nicht-alkoholische Fettleberhepatitis*). Ein Vergleich zur AIH, PBC und PSC soll vorgenommen werden, da es bei der NASH ebenfalls zum Einwandern eines entzündlichen, monozytären Infiltrats in das Leberparenchym kommt (Ludwig et al. 1980).

Die Methode des immunhistochemischen Nachweises erlaubt nicht nur Aussagen zur Anzahl, sondern auch zur Lokalisation und Morphologie der Populationen verschiedener Entzündungszellen. Die Erhebung klinischer, histologischer und laborchemischer Parameter soll einen umfangreichen Datensatz über die oben genannten vier Patientengruppen ermöglichen und eine Einordnung der immunhistochemischen Beobachtungen in das klinische Bild sicherstellen.

Die Ziele und Leitfragen dieser Arbeit lauten:

- Das Erstellen einer klinischen und laborchemischen Charakterisierung der Patientengruppen. Wie präsentieren sich die Patienten bei der Erstdiagnose?

- 
- Die Untersuchung der histologischen entzündlichen Aktivität der Patienten bei Erstdiagnose: Gibt es Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen? Wie ist der Zusammenhang mit dem klinischen Bild?
  - Charakterisierung des Entzündungszellinfiltrats, insbesondere in Hinblick auf FoxP3+ Tregs: Gibt es Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen? Entstehen neue Erkenntnisse hinsichtlich Anzahl und Verteilung regulatorischer T-Zellen? Gibt es einen Zusammenhang mit der Entzündungsaktivität?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Patienten

Die ausgewählten Patienten stammen aus dem Patientenkollektiv der I. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf (Direktor: Prof. A. W. Lohse) und sind an einer der vier in dieser Arbeit untersuchten Hepatopathien (AIH, PBC, PSC oder NASH) erkrankt. Bei allen Patienten (n=40) wurde im Rahmen der Erstdiagnose eine Gewebeprobe der Leber entnommen. Bei der Auswahl der Patienten wurden sowohl histologische als auch klinische Parameter berücksichtigt, die im Folgenden näher beschrieben werden.

Von vornherein ausgeschlossen wurden Patienten, welche sich zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits in einer chronifizierten oder sehr fortgeschrittenen Phase ihrer Erkrankung befanden, deren histopathologischer Befund dem Bild einer Zirrhose entsprach oder deren Lebergewebe -mit Ausnahme der Gruppe der NASH-Patienten- eine übermäßige Verfettung von mehr als 30% der Hepatozyten aufwies.

#### 2.1.2 Gewebe

Das Material für die immunhistochemischen Untersuchungen wurde aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf (Direktor: Prof. G. Sauter) zur Verfügung gestellt. Bei den verwendeten Proben handelte es sich um Leberbiopsien, die aus diagnostischen Gründen entweder perkutan oder laparoskopisch gewonnen wurden. Das Biopsiematerial stammte aus dem Zeitraum 2004 bis 2008. Nach Probenentnahme erfolgte die Lagerung in Formalin. Im Institut für Pathologie (Direktor: Prof. G. Sauter) wurden die ca. 1 - 2 cm langen Gewebezyylinder in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Zum Zweck der klinischen Diagnostik wurden im Anschluss ca. 5 µm dicke Schnitte erstellt und verwendet. Das übrige Gewebe wurde lichtgeschützt eingelagert und stand als Grundlage für die experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit zur Verfügung.

### 2.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 1: Verwendete Geräte und Materialien**

Gerät / Material	Hersteller
Autoklav, Selctomat S2000	Stork Tronic, Stuttgart
Brutschrank	Roth, Karlsruhe
Dako Autostainer, Universal Staining System	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Dampfgarer	Braun, Kronberg
Digitalkamera, AxioCam MRC	Carl Zeiss, Jena
Deckplättchen	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Falcon-Tubes	Sarstedt, Nümbrecht,
Feinwaage	Kern und Sohn, Balingen
Feuchte Kammer	<i>Eigenbau</i>
Glasbehälter	Roth, Karlsruhe
Handmikrotom	Thermo, Astmoore, Großbritannien
Incubation Container	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Küvetten	Roth, Karlsruhe
Magnetrührer	Roth, Karlsruhe
Mikroskop, Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss, Jena
Mikrowelle	Durabrand, Deutschland
Objektträger	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Objektträger, Superfrost/Plus	Karl Hecht, Sondheim
Parafilm	Pechiny, Düsseldorf
pH-Meter	Mettler Toledo, Giessen
Pipetten und Pipettenspitzen	Biohit, Rosbach v. d. Höhe
Pipetten und Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Reaktiongefäße Micro Tube	Sarstedt, Nümbrecht
Rotationsmikrotom	Thermo, Astmoore, Großbritannien
Schutzbrille, Model: Roma	PulSafe, Amsterdam, Niederlande
Thermometer	Ludwig Schneider, Wertheim
Wasserbad	GFL, Burgwedel

## 2.1.4 Chemikalien

Tabelle 2: Chemikalien

Gerät / Material	Beschreibung	Hersteller
Autostainer Kit	Code No. K5007	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
DAB-Chromogen	Artikel No K3465	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
DAB-Substratpuffer	Artikel No K3465	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
EDTA Tritriplex III	Artikel No. 108418	Merck, Darmstadt
Eindeckmedium Aquatex		Merck, Darmstadt
Eindeckmedium Eukitt		O. Kindler, Freiburg im Breisgau
En Vision (Polymer-HRP)	Artikel No K4065	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Eosin G Lösung, 0,5% wässrig	Artikel No. X883.2	Roth, Karlsruhe
Ethanol >99%	Artikel No. UN1170	Walter CMP GmbH, Hamburg
Methanol		J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Proteinase-K	Code No. S2019	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Proteinase-K Diluent	Code No. S2032	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Puffer: target retrieval solution, pH 9	Code No. S2367	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Tri-Na-Citrat-Dihydrat		Merck, Darmstadt
Tris Base		Merck, Darmstadt
Puffer: antibody diluent, pH 7,2	Code No. S2022	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Wasserstoffperoxid, 30%		Merck, Darmstadt
Xylene (Xylol)	Artikel No. 0750021	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Roticlear		Roth, Karlsruhe
Peroxidase Blocking Solution	Artikel No. S2023	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Citratpuffer, "Pro Taquastura"	Artikel No. 400300692	Biocyc, Luckenwalde
Wash Buffer 10x	Code No. S3006	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
TBS, Spülpuffer		
NaCl		J. T. Baker, Deventer, Niederlande
HCl		Merck, Darmstadt
Tris Base		Sigma, Seelze
TEC-Puffer		
EDTA Titriplex III		Merck, Darmstadt
Tri-Na-Citrat-Dihydrat		Merck, Darmstadt
Hämalaunlösung nach Mayer		
Hämalaun		Roth, Karlsruhe
Aluminiumkaliumsulfat Dodecahydrat		Riedel-de Haen, Seelze
Chloralhydrat		Merck, Darmstadt
Citronensäure		Merck, Darmstadt
Natriumjodat		Merck, Darmstadt

### 2.1.5 Lösungen und Puffer

#### TRIS-NaCl Puffer (=TBS: Tris-buffered-Saline)

12,10g TRIS, 17,52g NaCl, 90 ml 1n HCl, 1910ml Aqua dest.

pH Titrierung: ph 7,6 / 7,4

#### TEC Puffer (=Tris-EDTA Citrat-Puffer)

5g Tris Base, 10g EDTA Titriplex III, 6,4g Tri-Na-Citrat-Dihydrad, auffüllen auf 1L mit Aqua dest

pH Titrierung: ph 7,8 / 9,0

#### Hämalaun Gebrauchslösung

5g Hämalaun (Hämatoxylin) in 500 ml Aqua dest. heiß lösen und abkühlen lassen.

In Reihenfolge zugeben:

1g Natriumjodat

250g Aluminiumkaliumsulfat Dodecahydrat

250g Chloralhydrat

5g Citronensäure

Auffüllen auf 5L mit Aqua dest

#### BSA-TBS

0,5g BSA mit 50ml TBS auffüllen

#### Peroxidase Block

Wasserstoffperoxid in Methanol 1:60 verdünnt

### 2.1.6 Antikörper

In Tabelle 3 findet sich eine Übersicht der verwendeten Primärantikörper und die dazugehörigen Herstellerangaben. Alle Antikörper sind kontinuierlich gekühlt und bei 4 °C gelagert worden. Weiteres zu den Antikörpern, wie die optimale Verdünnung und welche Vorbehandlung zur Antigen-demaskierung verwendet wurde, werden im Abschnitt 2.2.2 *Durchführung der immunhistochemischen Färbung* erläutert.

**Tabelle 3: Antikörper (I)**

Primärantikörper	Beschreibung	Hersteller
CD3	Code No. M7254	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
CD4 (II)	Code No. M7310	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
CD8	Code No. M7103	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
CD20	Code No. M 0755	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
CD163	Code No. NCL-CD163	Vision Biosystems Novocastra, Großbritannien
MPO	Code No. A 0398	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Foxp3	Catalog No. 14-4777	NatuTec, Frankfurt
CD4 (I)	Catalog No. CM 153	Biocare, Concord, USA
CD56	Code No. NCL-CD56- 1B6	Vision Biosystems Novocastra, Großbritannien

### 2.1.7 Software

Tabelle 4 zeigt die Software, die zum Auswerten und Erstellen dieser Arbeit verwendet wurde. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mithilfe des Programms SPSS, die graphische Darstellung überwiegend mit GraphPrism.

**Tabelle 4: Verwendete Software**

Software	Hersteller
AxioVision 3.1	Zeiss, Jena
Photoshop 7.0	Adobe, München
FastStone ImageViewer	FastStone Soft, USA
MS Office Professional Edition 2003	Microsoft, Redmond, USA
EndNote X2	Thomson Reuters, Philadelphia, USA
Graph Prism 4.0	GraphPad Software, La Jolla, USA
SPSS, SPSS 11.5.1, deutsch	IBM, München

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Immunhistochemie

#### Prinzip der Immunhistochemie

Das Prinzip der Immunhistochemie beruht auf der gezielten Darstellung von Zell- und Gewebebestandteilen (Antigen) durch die Markierung mit spezifischen Antikörpern. Die Antigen-Antikörperbindung wird anschließend durch histochemische Methoden sichtbar gemacht (Pschyrembel und Dornblüth 2007; Böcker et al. 2008).

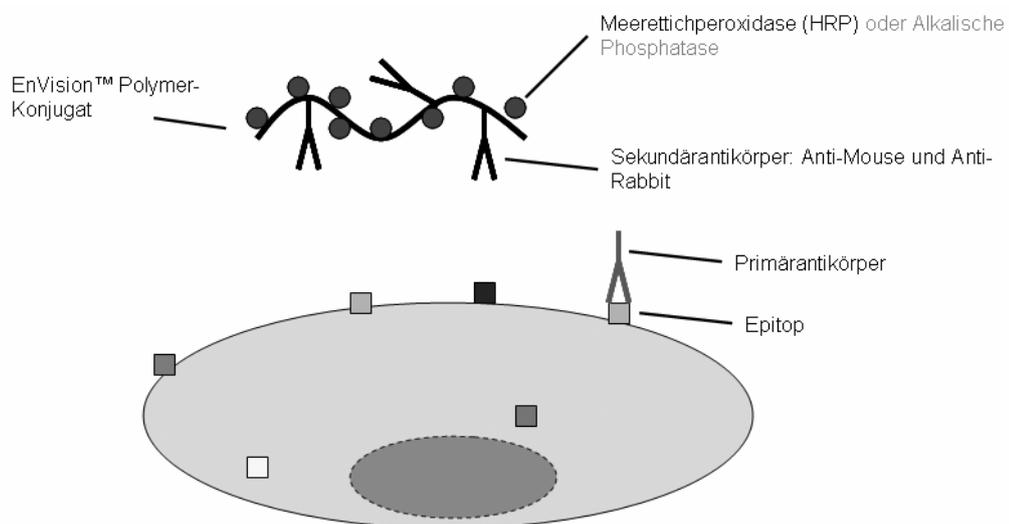
Bei den verwendeten Antikörpern wird zwischen polyklonalen und monoklonalen Antikörpern unterschieden. Polyklonale Antikörper stammen von verschiedenen B-Lymphozyten einer Spezies (häufig Kaninchen oder Maus) und können nach Immunisierung mit einem bestimmten Antigen gegen unterschiedliche Bindungsstellen (Epitope) dieses Antigens gerichtet sein. Monoklonale Antikörper hingegen werden aus immortalisierten Klonen einer Plasmazelle gewonnen. Sie sind identisch und reagieren mit den gleichen Epitopen des Antigens (Noll et al. 2000; Boenisch und Henne 2003).

#### Praktisches Vorgehen

Abhängig von der Beschaffenheit des Untersuchungsmaterials und der Art des Antigens bedarf es einiger Arbeitsschritte bevor der ausgewählte Antikörper an das Epitop binden kann. In Paraffin fixiertes Gewebe, wie das in dieser Arbeit verwendete Material, muss zunächst aus dem Paraffin herausgelöst und rehydriert werden. Durch die Formalinfixierung kann es zu einer Konformationsänderung der Epitope durch chemische Quervernetzung (Cross-Links) kommen (Böcker et al. 2008). Diese Veränderungen in der dreidimensionalen Struktur führen bei einigen Epitopen dazu, dass eine Antikörperbindung (teilweise) nicht mehr möglich ist und werden als „Antigenmaskierungen“ bezeichnet. Methoden zur Verbesserung bzw. Wiederherstellung der Immunreaktivität werden daher als „Antigendemaskierung“ oder „Antigen Retrieval“ bezeichnet. Zum Zweck der Antigendemaskierung kommt neben der Verwendung proteolytischer Enzyme heute vermehrt die hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER) zum Einsatz. Auch eine Kombination beider Verfahren ist möglich (Iczkowski et al. 1999). Die Notwendigkeit zur Antigendemaskierung und die Auswahl des optimalen Verfahrens sind vom jeweiligen Antigen abhängig. Die Festlegung der Variablen in den Verfahren zur Demaskierung (z.B. Auswahl des Enzyms, Art des Puffers, pH-Optimum, Inkubationsdauer etc.) richtet sich unter anderem nach der Antigenlokalisation, der Dauer der Formalinfixierung und der Art des Gewebes. Wichtige Hinweise liefern die Empfehlungen des Antikörper-

Herstellers und Erfahrungen mit unterschiedlichen Protokollen. Oftmals muss das optimale Verfahren zur jeweiligen Fragestellung individuell ermittelt werden (Boenisch und Henne 2003).

Ist das Epitop für einen Antikörper wieder optimal zugänglich, erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper. Dauer und Durchführung der Inkubationen richten sich ebenfalls nach optimierten Protokollen. Die Visualisierung der spezifischen Antigen-Antikörper Bindung ist Ziel der nächsten Schritte. Ist der Primärantikörper bereits mit einem Enzym markiert (konjugiert) und ist dieses bei Zugabe eines Substrats in der Lage eine Farbentwicklung hervorzurufen, spricht man von einer direkten oder Ein-Schritt Methode. In der klassischen Zwei-Schritt Methode wird ein Farbkomplex-konjugierter Sekundärantikörper zugegeben. Dieser ist gegen die speziesspezifische Fc-Komponente des unkonjugierten Primärantikörpers gerichtet. Mit dieser Methode ist es möglich, polyklonale Antikörper der gleichen Spezies mit demselben Sekundärantikörper zu markieren. Eine Reihe von Weiterentwicklungen und komplexere Methoden führten zu zusätzlichen Sensitivitätssteigerungen und vereinfachter Handhabung. Das in dieser Arbeit verwendete EnVision™ System der Fa. Dako arbeitet mit der sog. „Polymer-Konjugat-Methode“ und basiert auf Polysaccharidmolekülen (Dextran), die mit Enzymen und Sekundärantikörpern gekoppelt sind. Ein Dextranmolekül ist mit ca. 70 Enzymmolekülen und bis zu zehn Antikörpern beladen. Durch den Einsatz von Anti-Maus- und Anti-Kaninchen (IgG) Antikörpern ist das System sowohl für mono- als auch polyklonale Primärantikörper beider Spezies verwendbar (Noll et al. 2000; Boenisch und Henne 2003).

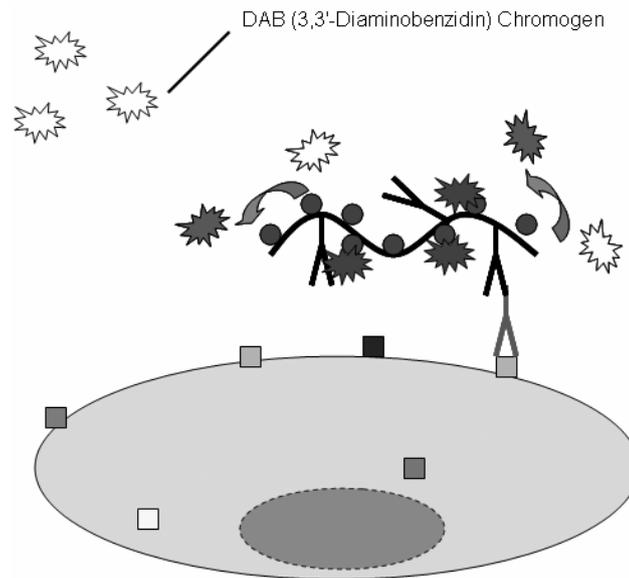


**Abbildung 2: Prinzip der Envision™ Methode (I)**

Schematische Komponentendarstellung der 2-Schritt-EnVision™-Methode, modifiziert nach Boenisch und Henne (2003)

Im verwendeten System wird die Farbentwicklung durch die Reaktion der Meerrettich-Peroxidase (HRP) und dem Chromogen 3,3'-Diaminobezidin (DAB) erreicht. Durch die Oxidation von DAB kommt es zur Polymerisation des Chromogens und damit zur Ausbildung eines unlöslichen, braunen Endprodukts. Zur Verbesserung der Färbeergebnisse kann es notwendig sein, die Aktivität der

ubiquitär vorkommenden endogenen Peroxidase des zu untersuchenden Gewebes mit einem gesonderten Puffer zu inhibieren (Peroxidase-Block), vgl. Boenisch und Henne (2003).



**Abbildung 3: Prinzip der EnVision™ Methode (II)**

Schematische Darstellung der Farbentwicklung der EnVision™-Methode, modifiziert nach Boenisch und Henne (2003)

Nach erfolgreicher immunhistochemischer Färbung wird das übrige, bisher nicht gefärbte, Gewebe durch eine sog. Gegenfärbung (z.B. HE) dargestellt. Abschließend erfolgt eine erneute Fixierung durch Dehydratation und das Eindecken des Materials auf dem Objektträger mit Emulsion und Deckgläschen.

### Färbeergebnis und Kontrollen

Der im vorigen Abschnitt schematisch dargestellte Färbeprovorgang gibt einen Einblick in die Komplexität der immunhistochemischen Färbeprotokolle. Optimierte Reagenzien, Verdünnungen und Bedingungen in jedem Schritt sind für ein gutes Färbeergebnis unerlässlich. Unerwünschte unspezifische Färbungen, sog. Hintergrundfärbungen, sind ein häufiges Problem und unterstreichen die Notwendigkeit zur Protokolloptimierung. Hintergrundfärbungen können viele Ursachen haben, exemplarisch seien hier Paraffinrückstände, hydrophobe Wechselwirkungen, endogene Enzymaktivität oder Kreuzreaktivität der Antikörper genannt (Noll et al. 2000; Boenisch und Henne 2003). Kontrollfärbungen sowie die genaue Beurteilung des Präparats liefern erste wichtige Hinweise bei der Beurteilung unspezifischer Färbungen.

Als Positivkontrolle wurden in dieser Arbeit Färbungen an lymphatischem Gewebe (Tonsille) durchgeführt, welches sicher und in definierter Lokalisation die meisten Zielproteine enthält (s. Tabelle 5). Anders als beispielsweise für Lymphozyten existiert für die Population der neutrophilen Granulozyten kein Gewebe welches diese Zellen in sicherer und großer Anzahl aufweist.

**Tabelle 5: Tonsillengewebe**

Tonsillengewebe	
Randzone	T-Zellen (CD3, CD4, CD8, Foxp3)
Follikelzone	B-Zellen (CD20)
Sinus	Makrophagen (CD163)

Positivkontrollen an Tonsillengewebe wiesen vereinzelte MPO-positive Zellen mit einem deutlich granulären Färbemuster auf. Diese Beobachtung deckte sich mit den Angaben des Herstellers. Im Institut für Pathologie (Direktor: Prof. G. Sauter) wird der MPO-Antikörper mit dem hier verwendeten Protokoll regelhaft in der Routinediagnostik akuter Leukämien verwendet.

Für die negativen Kontrollfärbungen wurden unspezifische Antikörper der IgG-Fractionen und reine Pufferlösung (TBS) anstelle des Primärantikörpers verwendet.

### Dargestellte Antigene und ihre Lokalisation

Bei der Betrachtung und Auswertung der immunhistochemischen Färbungen spielt die Lokalisation der Zellantigene eine wichtige Rolle. Man unterscheidet eine intrazelluläre (IZ) von einer plasmamembranösen (PM) Lokalisation bzw. Darstellung des Antigens. Ein intrazelluläres Signal in der immunhistochemischen Darstellung kann als Verteilung des Antigens auf endomembranären Strukturen oder im Zytoplasma interpretiert werden. Gelegentlich stellt sich auch ein vesikuläres oder granuläres Expressionsmuster als intrazelluläres Signal dar. Eine Übersicht über die zu erwarteten Färbemuster und die Lokalisation der verwendeten Antigene zeigt Tabelle 6.

**Tabelle 6: Antigenlokalisation**

Antigen	Lokalisation / Färbeergebnis
CD3	PM und IZ
CD4	PM
CD8	PM
Foxp3	IZ, Kern
CD20	PM an der intrazellulären Seite <sup>1</sup>
CD163	PM
MPO	IZ - granulär
CD56	PM

<sup>1</sup> das lange n- und c-terminale Ende des Transmembranproteins sind das Antigen und liegen auf der intrazellulären Seite der Plasmamembran

## **Automatisierung in der Immunhistochemie**

Der vermehrte Einsatz immunhistochemischer Färbungen in der Routinediagnostik führte zur Entwicklung von Färbeautomaten, welche die wesentlichen Inkubations- und Spülschritte durchführen. Man unterscheidet offene und geschlossene Systeme. Zu den geschlossenen Systemen zählt die Kapillarspaltmethode, bei der ein ca. 50 µm breiter Spalt durch Kapillarkräfte zur Inkubation mit Flüssigkeiten befüllt und wieder entleert wird. Im offenen System wird der manuelle Färbevorgang nachvollzogen. Die Objektträger sind horizontal fixiert und die Reagenzien werden automatisch auf das Gewebe pipettiert, inkubiert und gespült. Der Automat kann prinzipiell mit allen Reagenzien befüllt werden und so eine große Reihe von Protokollen ausführen. Unter Verwendung im Vorfeld manuell optimierter Protokolle kam für diese Arbeit der Autostainer der Fa. Dako zum Einsatz, welcher mit einem offenen System arbeitet.

### **2.2.2 Durchführung der immunhistochemischen Färbung**

#### **Anfertigung der Schnitte**

Das in Paraffin fixierte Gewebe der Leberbiopsien wurde entweder mit einem Rotationsmikrotom oder einem Handmikrotom in eine Dicke von ca. 5 µm geschnitten. Die Schnitte wurden in ein heißes Wasserbad (ca. 45 °C) übertragen, auf einen Objektträger aufgebracht und über Nacht bei 60 °C in einem Brutschrank getrocknet.

#### **Entparaffinierung und Rehydrierung**

Um das Gewebe aus dem Paraffin herauszulösen wurden die Schnitte zunächst dreimal für fünf Minuten in Xylol eingetaucht und im Anschluss jeweils drei Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 90%, 70%, 50%, 20%) rehydriert. Anschließend erfolgte eine Spülung mit destilliertem Wasser (H<sub>2</sub>O dd).

#### **Antigendemaskierung**

Die notwendige Vorbehandlung zur Demaskierung der Antigene zum Erzielen optimaler Färberegebnisse war von den Eigenschaften des Epitops bzw. des Primärantikörpers abhängig. In der Regel erfolgte eine hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER). Nur bei der Färbung auf MPO wurde eine Proteinandaunung mit Proteinase K durchgeführt. Eine Übersicht zeigt Tabelle 7.

**Tabelle 7: Antigendemaskierung**

Antigen	Vorbehandlung
CD3, CD4, CD8, CD 20 und CD56	20 Min. in vorgeheizter Pufferlösung (Fa. Dako) im Dampfgarer (95-99°C) 20 Min. abkühlen Spülen mit TBS Puffer (pH 7,6)
MPO	10 Min. Proteinandauung mit Proteinase-K in Proteinase-K-Diluent (1:40, Fa. Dako) Spülen mit TBS Puffer (pH 7,6)
Foxp3	5 Min. in Citratpuffer (pH 7) im Autoklaven, Programmdauer ca. 1Std.
CD 163	20 Min. in vorgeheiztem TEC-Puffer (pH 7,8) im Dampfgarer (95-99°C) 20 Min. abkühlen Spülen mit TBS Puffer (pH 7,6)

### **Blockade der endogenen Peroxidase**

Zur Blockade der endogenen alkalischen Phosphatase-, Peroxidase- und Pseudoperoxidase-Aktivität wurde das Gewebe für 10 Minuten in mit Methanol verdünnter Wasserstoffperoxidlösung gelagert und anschließend mit PBS gespült.

### **Blockade unspezifischer Bindungen**

In vielen herkömmlichen Protokollen der Immunhistochemie erfolgt als weiterer Schritt in der Vorbehandlung die Absorption von Brückenantikörpern mittels Normalserum der gleichen Spezies wie das zu färbende Gewebe. Diese Maßnahme soll unspezifische Hintergrundfärbungen reduzieren (Boenisch und Henne 2003). Diese Methode wurde in dieser Arbeit bei einigen der manuellen Protokolle ebenfalls eingesetzt. Humanserum wurde 1:10 mit BSA-TBS (1% BSA in TBS) verdünnt, etwa 50-100 µl dieser Lösung wurden auf den Schnitt pipettiert, bis das Gewebe vollständig bedeckt war. Überschüssige Flüssigkeit wurde abgewischt und die Schnitte für 20 Minuten bei Raumtemperatur in der Feuchte Kammer inkubiert. Nach vorsichtigem Abkippen des Serummixes erfolgte keine Spülung, sondern direkt die Inkubation mit dem Primärantikörper.

### **Inkubation mit dem Primärantikörper**

Die Antikörperlösungen wurden zunächst mit BSA-TBS verdünnt. Der Zusatz von BSA zum Antikörper-Verdünnungsmedium ist eine Methode zur Reduzierung von Hintergrundfärbungen infolge hydrophober Bindungen. Nach Zugabe von ca. 50-100 µl der Primärantikörperlösung (Menge abhängig von der Größe des Gewebes) wurden die Schnitte über Nacht in der feuchten Kammer lichtgeschützt und bei Raumtemperatur inkubiert und am nächsten Tag mit PBS gespült. Folgende Antikörper und Verdünnungen wurden verwendet:

**Tabelle 8: Antikörper (II)**

Primärantikörper	Klonalität / Spezies	Ig Subtyp	Verdünnung
CD3	Monoklonal, Maus	IgG1, kappa	1:25
CD4 (II)	Monoklonal, Maus	IgG1, kappa	1:50
CD8	Monoklonal, Maus	IgG1, kappa	1:50
CD20	Monoklonal, Maus	IgG2a, kappa	1:100
CD163	Monoklonal, Maus	IgG1	1:100
MPO	Polyklonal, Kaninchen	-	1:2500
Foxp3	Monoklonal, Maus	IgG1	1:200
CD4 (I)	Monoklonal, Maus	IgG1	1:25
CD56	Monoklonal, Maus	IgG1	1:50

### **Inkubation mit dem Sekundärantikörper**

Jeweils ca. 50-100 µl des gebrauchsfertigen Envision™ Systems wurden auf das Gewebe pipettiert. Die EnVision™ Komponente beinhaltet Dextran, an das Peroxidase-Moleküle und Sekundärantikörper (Ziege) gegen die primären (Maus und Kaninchen) Immunglobuline gekoppelt waren. Gewebe und Sekundärantikörper wurden für 30 Minuten in der feuchten Kammer lichtgeschützt und bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Spülung erfolgte erneut mit PBS.

### **Detektion**

Ein Tropfen (ca. 20 µl) DAB-Chromogen wurde zu 1000 µl DAB-Substrat-Puffer gegeben. Die DAB Chromogen Komponente beinhaltet 50-fach konzentriertes 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid in organischem Lösungsmittel. Der Substrat-Puffer beinhaltet Wasserstoffperoxid. 50-100 µl des verdünnten Chromogens wurden auf den Schnitt pipettiert und für 7-11 Minuten auf dem Gewebe belassen. Ein Ende der Farbreaktion wurde durch die Spülung mit H<sub>2</sub>O erreicht. Die Arbeiten erfolgten aufgrund der Toxizität des Chromogens unter dem Abzug.

### **Dehydrierung und Kernfärbung**

Nach erfolgreicher immunhistochemischer Färbung wurde das Gewebe jeweils 3 Minuten in einer aufsteigenden Alkoholreihe (20%, 50%, 70%, 90%, 100%) umspült und dreimal 10 Minuten in Xylol eingetaucht. Hierdurch erfolgte eine erneute Dehydrierung und Fixierung des Gewebes.

Anschließend erfolgte ein kurzes Eintauchen (wenige Sekunden) in eine Hämalunlösung nach Mayer und ein zehnmütiges Bläuen unter Leitungswasser. Nach Abtupfen des überschüssigen Wassers auf dem Objektträger wurde dem gefärbten Gewebe ein Tropfen Eindeckmedium zugegeben und ein Deckgläschen aufgelegt.

### **Färbung im Dako Autostainer**

Im Autostainer konnten viele der Inkubations- und Spülschritte des manuellen Färbeprozesses automatisiert durchgeführt werden. Entparaffinierung und Rehydrierung erfolgten weiterhin manuell.

Auch die Antigendemaskierung wurde unter Verwendung anderer Geräte außerhalb des Autostainers durchgeführt. Nur bei der Färbung auf MPO erfolgte die Proteinandauung mit Proteinase K in der oben genannten Lösung bereits im Gerät. Im manuellen Färbevorgang ist die Aktivität der endogenen Peroxidase mit in Methanol verdünntem Wasserstoffperoxid blockiert worden. Im Autostainer wurde zur Blockade -wie vom Hersteller empfohlen- die „Peroxidase Blocking Solution“, Fa. Dako, Code No. S2023 verwendet. Soweit vom Hersteller veröffentlicht, beruhte diese auf den gleichen Chemikalien und Prinzipien. Die Inkubation mit dieser Lösung dauerte 10 Minuten, gefolgt von einer Spülung mit TBS. Primär- und Sekundärantikörper wurden für 25 bzw. 30 Minuten inkubiert, jeweils gefolgt von TBS Spülungen. Die Primärantikörper wurden mit dem Verdünnungspuffer der Fa. Dako verdünnt. Das im Autostainer zur Sekundärantikörperinkubation und Farbreaktion eingesetzte Kit K5007 der Fa. Dako besteht, wie bei der manuellen Färbung, aus drei Komponenten: Dem Sekundärantikörper und Enzymgekoppelten Polymer (Dako REAL™ EnVision™ Detection System), einem Substrat Puffer und dem Chromogen DAB. Die Detektionsschritte dauerten im Gerät zwei mal fünf Minuten. Dehydrierung und Kernfärbung erfolgten wieder manuell wie oben beschrieben.

In den optimierten, mit dem Autostainer und dem EnVision™ System verwendeten Protokollen erfolgte an keiner Stelle die vorangehend beschriebene Blockade unspezifischer Bindungen mit einer Humanserum-BSA-TBS Lösung.

### **2.2.3 Auswertung**

#### **2.2.3.1 Quantitative Auswertung**

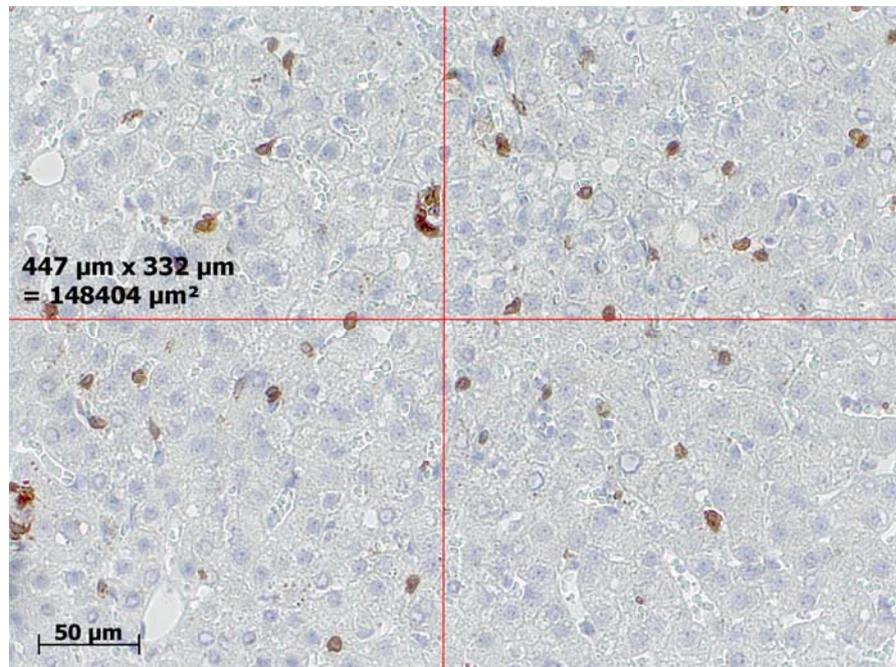
Das immunhistochemisch gefärbte Gewebematerial wurde lichtmikroskopisch ausgewertet. Nach Durchsicht des gesamten histologischen Präparates wurden jeweils sechs repräsentative Blickfelder in 200-facher Vergrößerung (Okular 10-fach, Objektivrevolver 20-fach) mithilfe der integrierten digitalen Kamera fotografiert und mit der Software Axiovision 3.1 erfasst und archiviert. Es wurden jeweils drei Bilder von portalem und drei Bilder von lobulärem Lebergewebe erstellt, in der Fläche vermessen und ausgewertet.

#### **Auswahl und Vermessung des lobulären Lebergewebes**

Nach Durchsicht des gesamten histologischen Präparates wurden drei Läppchenregionen ausgewählt, in denen sowohl die Verteilung immunhistochemisch positiver Zellen, als auch die Gewebestruktur repräsentativ für das gesamte Präparat war. Ausgenommen sind Areale und gelegentlich ganze Schnitte aufgrund folgender Kriterien:

- grobe Defekte
- originärer Strukturverlust durch starke Fibrose oder Zirrhose (Böcker et al. 2008)

- Paranchymverfettung >30 % (ausgenommen hierfür waren die Patienten der NASH-Gruppe)



**Abbildung 4: Vermessung von lobulären Lebergewebe**

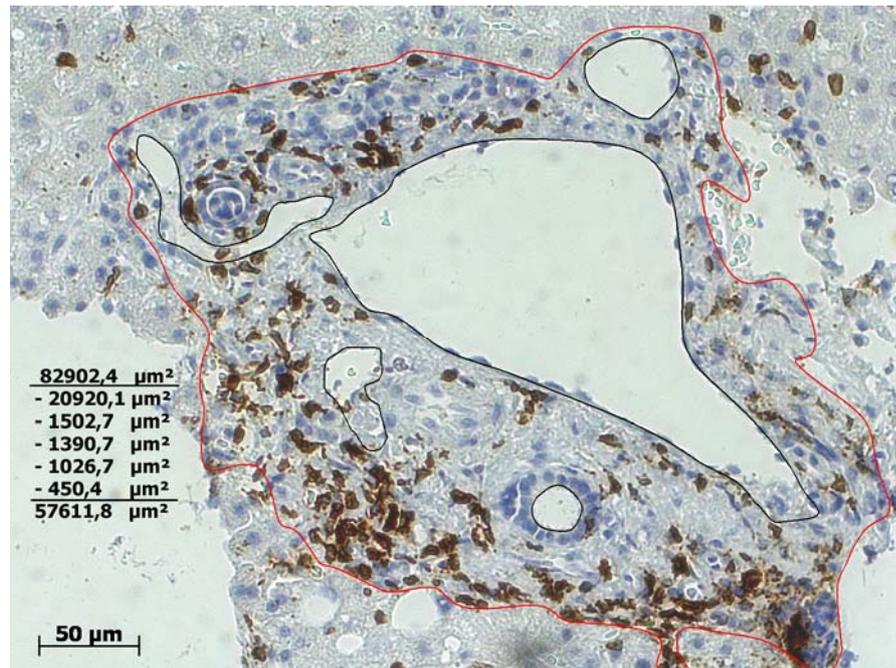
*hier: CD3 Färbung, Pat: PBC-9*

### **Auswahl und Vermessung des portalen Lebergewebes**

Analog zum Vorgehen im Leberläppchen wurden drei Portalfeldregionen ausgewählt und erfasst, welche repräsentativ für den gesamten Schnitt waren. Gefäß- und Gallenganglumina über  $150 \mu\text{m}^2$  innerhalb des Portalfeldes wurden ebenfalls vermessen und von der Gesamtfläche abgezogen. Die standardisierte Verwendung solcher „Nettoflächen“ erhöhte die Vergleichbarkeit. Aufgrund sehr kleiner Gewebeproben wurden in zwei Fällen auch zwei Portalfelder als repräsentativ angesehen und ausgewertet. Erfüllte nur ein Portalfeld alle festgelegten Kriterien, wurde eine Auswertung vorgenommen.

Ähnlich wie beim lobulären Leberparenchym wurden aus folgenden Gründen Areale und gelegentlich ganze Schnitte nicht verwendet:

- grobe Defekte
- originärer Strukturverlust durch starke Fibrose oder Zirrhose
- nicht eindeutig als Portalfeld erkennbar. Geforderte Strukturen waren mindestens zwei der drei Bestandteile der Virchow Trias (Gallengang, Vene, Arterie) (Böcker et al. 2008)



**Abbildung 5: Vermessung von portalem Lebergewebe**

*hier:* Cd3 Färbung, Pat: PBC-9; die schwarz markierten Flächen wurden aufgrund o. g. Kriterien von der ursprünglichen Fläche (rot) abgezogen.

### Auswertung der ausgewählten Areale

Die immunhistochemisch positiven Zellen wurden in der abgemessenen Fläche gezählt und dokumentiert. Zellzahl und ausgemessene Fläche wurden miteinander in ein Verhältnis gesetzt (Zellen/mm<sup>2</sup>). Jeweils gesondert für Portalfeld und Läppchen wurde anschließend für die weitere statistische Auswertung aus den, in der Regel drei, Werten pro Gewebeprobe die durchschnittliche Zellzahl pro Millimeter berechnet und dokumentiert. Als positiv wurden Zellen betrachtet, deren Morphologie sich kongruent zum entsprechenden Zelltypus verhielt und deren Färbemuster mit der bekannten Antigenlokalisation übereinstimmte (vgl. Abschnitt 3.3 *Qualitative Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen*).

Die Auswertung erfolgte geblindet. Der Auswertende hatte zum Zeitpunkt der quantitativen Auswertung keine Kenntnisse über die Diagnose oder weitere Patientendaten.

#### 2.2.3.2 Pathologisches Grading

Das histologische Material wurde von einem Oberarzt des Instituts für Pathologie (Direktor: Prof. G. Sauter) befundet und anhand des modifizierten Hepatitis Aktivitätsscore (mHAI) nach Ishak et al. klassifiziert (Ishak und Zimmerman 1995; Longerich et al. 2008). Die Auswertung erfolgte ebenfalls geblindet. Der Pathologe hatte zum Zeitpunkt der Befundung keine Kenntnisse über die aktuelle Diagnose oder weitere Patientendaten. Tabelle 9 zeigt die Zusammensetzung des mHAI-Scores. Insgesamt wurden 0-18 Punkte vergeben.

**Tabelle 9: Der modifizierte histologische Aktivitätsindex (mHAI)**

Kategorie	Punktwert	Beschreibung
Interface Hepatitis	0	Keine
	1	Fokal, wenige Portalfelder
	2	Fokal, Mehrzahl der Portalfelder
	3	Kontinuierlich um <50% der Portalfelder
	4	Kontinuierlich um >50% der Portalfelder
Konfluente Nekrose	0	Keine
	1	Fokal
	2	Zone-3-Nekrosen, wenige
	3	Zone-3-Nekrosen, zahlreiche
	4	Zone-3- und einzelne portozentrale Brücken
	5	Zone-3- und multiple portozentrale Brücken
Einzelzelluntergänge	0	Keine
	1	Bis 1 Herd pro Gesichtsfeld (10er Objektiv)
	2	2-4 Herde pro Gesichtsfeld (10er Objektiv)
	3	5-10 Herde pro Gesichtsfeld (10er Objektiv)
	4	>10 Herde pro Gesichtsfeld (10er Objektiv)
Portale Entzündung	0	Keine
	1	Gering, wenige oder alle Portalfelder
	2	Mäßig, wenige oder alle Portalfelder
	3	Mäßig/Ausgeprägt, alle Portalfelder
	4	Ausgeprägt, alle Portalfelder

Zusätzlich zu dem mHAI-Score wurde von jedem Patienten der zum Biopsiezeitpunkt erstellte Originalbefund des Instituts für Pathologie (Direktor: Prof. G. Sauter) erfasst und mit weiteren Daten abgeglichen. Die Befunde lieferten vor allem im Anfangsstadium der Arbeit erste wichtige Hinweise, ob die Probe für einen Einschluss in die Untersuchung in Frage kommen konnte (z.B. Anzahl von Portalfeldern, Befund mit Frühstadium der Erkrankung vereinbar etc.).

### 2.2.3.3 Erfassung der klinischen Parameter

Weitere Daten der Patienten wurden aus den Unterlagen des Zentralarchivs, der Ambulanzarchive und den digitalen Dokumentationssystemen des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf gewonnen. Die Daten wurden anonymisiert verwendet. Jeder Patient erhielt eine Gruppenspezifische ID kombiniert mit einer fortlaufenden Nummer (z.B. „AIH-3“). Eine Übersicht über die von jedem Patienten erfassten Daten zeigt Tabelle 10.

**Tabelle 10: Klinische Parameter**

Klinische Parameter - zum Zeitpunkt der Biopsie	
Basisdaten	Alter, Geschlecht
Dokumentation	Diagnose, Zeitpunkt der Erstdiagnose, Dauer der Erkrankung  weitere Diagnosen (gesondert: chronisch entzündliche Darmerkrankung, weitere (auto)immunologische Erkrankungen)  Medikamente (gesondert: Ursodesoxycholsäure, Cortison, weitere Immunsuppressiva)
Klinische Chemie	Leukozyten, Thrombozyten, Bilirubin, Transaminasen (AST, ALT), Alkalische Phosphatase, Albumin
Immunglobuline	IgG, IgM, IgG% am Gesamteiweiß
Antikörperdiagnostik	ANA, AMA, LKM, SLA, SMA, P-ANCA

#### 2.2.3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mithilfe der Software SPSS. Zur graphischen Darstellung wurde zusätzlich die Software Graph Prism verwendet. Unterstützt wurde die statistische Auswertung durch das Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf (Direktor: Prof. K. Wegscheider).

Vorraussetzung für die Durchführung vieler wichtiger statistischer Tests ist die Normalverteilung der Daten (Rasch 2008a). Die graphische Darstellung im Histogramm und die Analyse des vorliegenden Datensatzes mithilfe des Kolmogorow-Smirnow-Tests lieferten Hinweise auf eine Normalverteilung der Daten (Altman und Bland 1995; Altman und Bland 2009). Häufig ist eine Normalverteilung bei biologischen Daten und kleinen Stichproben nicht gegeben bzw. nicht eindeutig erkennbar. So erzeugt z.B. eine sich exponentiell vermehrende Zellpopulation eine natürliche Schiefe im Datensatz (Berry 1987; Stahel 2008). Eine häufig verwendete Methode um eine natürliche Schiefe von Daten auszugleichen ist die Transformation der Daten (Berry 1987; Stahel 2008), z.B. durch Berechnung des Logarithmus naturalis ( $\ln$ ). Um die Richtigkeit der Annahme von Normalverteilung bei den erfassten Zellzahlen und laborchemischen Parametern zu stärken, erfolgte in Rücksprache mit dem Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie (Direktor: Prof. K. Wegscheider) für die vergleichende Analyse der vier Gruppen eine Logarithmierung dieser Daten.

Die Vergleiche der Gruppen untereinander wurden mittels einer ANOVA-Analyse und anschließender post-hoc Ausgabe nach Bonferoni (s.u.) durchgeführt. Diese Form der ANOVA-Analyse ist beim Vergleich mehrerer Gruppen in seiner Aussagekraft der alternativen multiplen Durchführung von T-Tests überlegen (Altman und Bland 1996; Bender et al. 2007a; Rasch 2008b). Bei vier Grup-

pen hätte dies der Durchführung von sechs T-Tests entsprochen. Eine solche mehrfache Testung mittels T-Tests ohne Korrektur ist nicht zulässig, da es zu einer Kumulierung des Alphafehlers kommt. Gemeint ist die Erhöhung des Fehlers der 1. Art (das Ablehnen einer Nullhypothese, obwohl diese wahr ist) durch falsch-positive Ergebnisse aufgrund von multiplen Tests in einer Stichprobe (Bender et al. 2007b).

Die Bonferoni-Korrektur ist ein einfacher und häufig angewandter mathematischer Ausgleich bei mehrfacher Testung. Wenn man „n“ unabhängige Hypothesen an einem Datensatz testet und deren Ergebnisse im Einzelnen verwenden möchte, so entspricht das mathematische Signifikanzniveau  $1/n$  der Signifikanz, die sich beim Test von nur einer Hypothese ergeben hätte (Bland und Altman 1995; Rasch 2008b).

Bei den Analysen im Abschnitt *3.5 Korrelative Betrachtungen* werden bivariate Korrelationsanalysen mit Angabe des Korrelationskoeffizienten nach Pearson durchgeführt. Bei einem Korrelationskoeffizienten  $>0,5$  und einem signifikanten p-Wert wird von einem statistischen Zusammenhang gesprochen.

Eine statistische Signifikanz wird bei p-Werten  $<0,05$  angenommen und in graphischen Darstellungen mit einem \* gekennzeichnet. Sehr hohe Signifikanzen mit p-Werten  $<0,001$  erhalten die Markierung \*\*. In den graphischen Abbildungen wird, wenn nicht anders beschrieben der Median eingezeichnet.

## 3 Ergebnisse

Zu Beginn dieses Kapitels werden die klinischen Parameter und die Ergebnisse des mHAI-Scorings dargestellt. Die Daten sollen einen Überblick über die vier untersuchten Patientengruppen geben und erste Unterschiede in der entzündlichen Aktivität aufzeigen. Um die Interpretation der immunhistochemischen Quantifizierungen zu erleichtern, werden die qualitativen Ergebnisse der einzelnen Färbungen im nächsten Abschnitt kurz präsentiert.

Kernstück dieser Arbeit bilden die quantitativen Ergebnisse, d.h. die Daten der Auszählungen der verschiedenen Zellpopulationen, getrennt nach ihrer Lokalisation in den Portalfeldern und den Leberläppchen. Auch die statistische Analyse der immunhistochemischen Ergebnisse erfolgt an dieser Stelle. Basierend auf den bisherigen Beobachtungen werden abschließend relevante Verhältnisse einiger Zellpopulationen dargestellt und vergleichende Analysen der klinischen, histologischen und immunhistochemischen Ergebnisse durchgeführt.

### 3.1 Patienten und klinische Parameter

Insgesamt 40 der eingangs über 60 erfassten Patienten erfüllen die in den vorangehenden Abschnitten beschriebenen Kriterien und sind in die Untersuchungen und Auswertungen dieser Arbeit aufgenommen worden. Alle Gewebeproben stammten aus dem Zeitraum zwischen 2004 und 2008 und wurden den Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose einer NASH (n=8), PSC (n=7), PBC (n=13) oder AIH (n=12) Erkrankung entnommen. Aus den gleichen Zeiträumen stammen auch die entsprechenden klinischen Parameter.

Tabelle 11 zeigt eine Übersicht der klinischen und laborchemischen Parameter der einzelnen Gruppen. Der retrospektive Ansatz der Erhebung verhindert den Einfluss auf mögliche Unvollständigkeiten.

Jedem Patienten wurde eine anonymisierte ID, bestehend aus der Patientengruppe und einer fortlaufenden Zahl, zugeordnet (Beispielsweise PSC-3). Wird im Folgenden auf die Ergebnisse einzelner Patienten verwiesen, so ist dies durch die Angabe der jeweiligen ID zu erkennen.

**Tabelle 11: Übersicht: Klinische Parameter**

	NASH (n=8)	PSC (n=7)	PBC (n=13)	AIH (n=12)
Alter (Jahren)	40 (17-61)	37 (21-60)	56 (44-70)	49 (22-70)
Geschlecht (m/w)	3 / 5	5 / 2	1 / 12	2 / 10
mHAI (0-18 Punkte)	2,5 (2-4)	3 (2-6)	4 (2-8)	8 (5-12)
AST/GOT (U/l)	(10-35 U/l) <sup>a</sup> 45 (28-59) <sup>1</sup>	48 (37-261)	35 (23-74)	73,5 (39-845)
ALT/GPT (U/l)	(10-35 U/l) <sup>a</sup> 66 (30-102) <sup>1</sup>	81 (38-651)	41 (15-93)	125 (32-1979)
Bilirubin, gesamt (mg/dl)	(0,2-1,0 mg/dl) 0,8 (0,2-1,6) <sup>2</sup>	0,6 (0,4-11,0)	0,6 (0,2-1,1)	0,7 (0,3-9,3)
Alkalische Phosphatase (U/l)	(35-104 U/l) 81 (44-107) <sup>1</sup>	176 (67-437)	122 (52-740)	119 (62-366)
IgG (g/l)	(7-16 g/l) 11,1 (7,7-17,1) <sup>3</sup>	10,9 (7,1-24,7)	13,2 (9,5-28,4)	17,2 (11,8-36,8)
IgM (g/l)	(0,4-2,3 g/l) 0,9 (0,6-1,5) <sup>3</sup>	0,8 (0,6-2,0) <sup>1</sup>	2,1 (1,1-4,8)	1,1 (0,5-4,0)

Median (range)

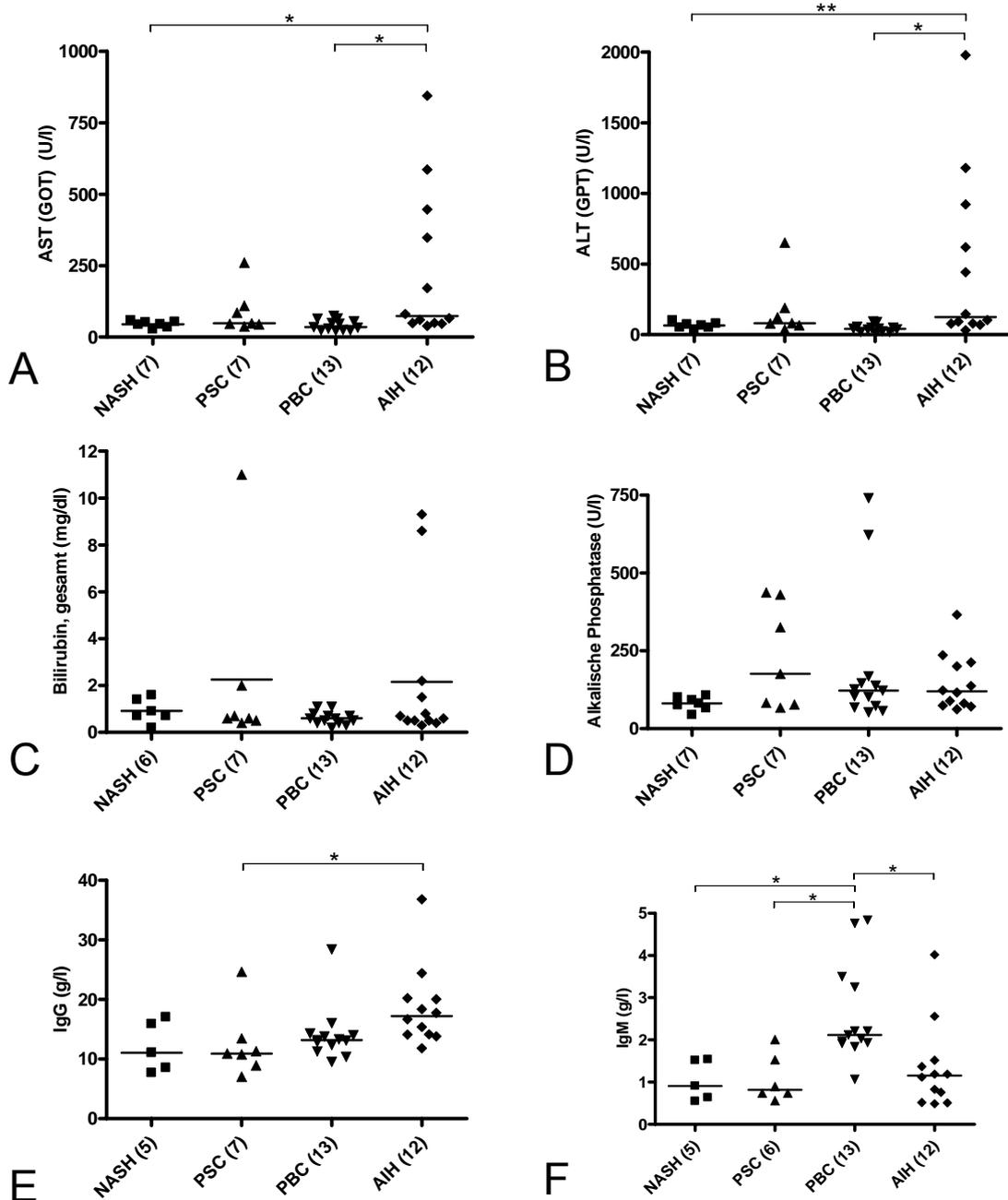
<sup>a</sup> geschlechtsspezifisch, hier: w

<sup>1</sup> Daten von einem Pat. der Gruppe unbekannt bzw. nicht bestimmt

<sup>2</sup> Daten von zwei Pat. der Gruppe unbekannt bzw. nicht bestimmt

<sup>3</sup> Daten von drei Pat. der Gruppe unbekannt bzw. nicht bestimmt

In den folgenden experimentellen Untersuchungen liegt der Schwerpunkt in der Evaluation der entzündlichen Aktivität und den beteiligten Zellpopulationen. Um diese Daten in einem klinischen Zusammenhang zu betrachten zeigt Abbildung 6 (A-F) eine graphische Darstellung der laborchemischen Parameter und die statistischen Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen bei Erstdiagnose der jeweiligen Erkrankung.



**Abbildung 6: Laborchemische Parameter**

Median

A: AST (GOT) (AIH-PBC  $p=0,002$ , AIH-NASH  $p=0,029$ )

B: ALT (GPT) (AIH-PBC  $p<0,001$ , AIH-NASH  $p=0,036$ )

C: Bilirubin gesamt (ns)

D: alkalische Phosphatase (ns)

E: IgG (AIH-PSC  $p=0,4$ )

F: IgM (AIH-PBC  $p=0,004$ , PBC-PSC  $p=0,009$ , PBC-NASH  $p=0,012$ )

Bei der Auswertung der laborchemischen Parameter fallen insbesondere Unterschiede in der erhöhten Transaminasenaktivität bei Erstdiagnose auf. In der Gruppe der NASH- und PBC-Patienten finden sich häufig normwertige oder nur gering erhöhte Transaminasen. Die maximale Erhöhung der ALT bei einem PBC-Patienten entspricht beispielsweise nur dem 2,5-fachen Normwert, wäh-

rend in den Gruppen der PSC- und AIH-Patienten Erhöhung um das 13-, bzw. 56-fache beobachtet werden können (vgl. Anhang: Tabelle 21). Die Patienten der AIH-Gruppe weisen im Vergleich zu den an NASH und PBC erkrankten Patienten signifikant erhöhte Transaminasen auf (AST: AIH-PBC  $p=0,002$ , AIH-NASH  $p=0,029$ ; ALT: AIH-PBC  $p<0,001$ , AIH-NASH  $p=0,036$ ).

Bei der Betrachtung der Cholestase-Parameter Bilirubin (gesamt) und der alkalischen Phosphatase ergibt sich ein ungleiches Bild. Bei der alkalischen Phosphatase zeigen auch die Patienten der PBC-Gruppe deutlich erhöhte Werte. Der höchste Wert findet sich in dieser Gruppe und beträgt das 7,6-fache des Normwertes. Das Immunglobulin IgM (Abbildung 6: E) ist in der Gruppe der PBC-Patienten deutlich erhöht (vgl. Abschnitt 1.5.2 *Die Primär Biliäre Zirrhose*). Im Vergleich zu den anderen drei Gruppen ist die Erhöhung signifikant ( $p<0,012$ ).

Erhöhte Werte der Immunglobuline vom IgG-Typ sind Teil der aktuellen Empfehlungen zur Diagnose der autoimmunen Hepatitis (vgl. Abschnitt 1.5.1 *Die Autoimmune Hepatitis*, (Hennes et al. 2008)). Auch in dieser Arbeit weisen die Patienten der AIH-Gruppe im Mittel über der Norm erhöhte Werte auf. Bei 7 der 12 AIH-Patienten wurde erhöhte IgG Werte gemessen. Die Erhöhung ist im Vergleich zu PSC-Patienten signifikant ( $p=0,4$ ). In den anderen drei Gruppen finden sich nur vereinzelt erhöhte IgG-Werte (4 von 28 Patienten).

Des Weiteren wurde zum Zeitpunkt der Erstdiagnose der Antikörperstatus der jeweiligen Patienten erhoben. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 12. Bei der Diagnose einer NASH oder PSC spielen Autoantikörper eine eher untergeordnete Rolle. Entsprechend häufiger sind in diesen Gruppen negative oder fehlende Befunde.

**Tabelle 12: Antikörperstatus**

		NASH (n=8)	PSC (n=7)	PBC (n=13)	AIH (n=12)
	(Referenz)	pos / neg (unbek)			
ANA	(Titer < 1:80)	1/3 (4)	2/3 (2)	4/7 (2)	7/2 (3)
SMA	(Titer < 1:80)	0/6 (2)	1/5 (1)	1/11 (1)	6/5 (1)
LKM	(Titer < 1:80)	0/6 (2)	0/6 (1)	0/12 (0)	1/10 (1)
SLA	(Titer < 1:80)	0/6 (2)	0/5 (2)	0/11 (2)	1/7 (4)
AMA	(<3 U/ml)	0/6 (2)	0/6 (2)	12/0 (1)	0/11 (1)
M2	(Titer < 1:80)	0/2 (6)	0/4 (3)	9/1 (3)	0/4 (8)

Laut Literatur ist bei bis zu 95% der PBC-Patienten ist ein positiver Antikörperbefund zu erwarten (Hirschfield und Heathcote 2008). Betrachtet man die für die Diagnose einer PBC relevanten Antimitochondrialen Antikörper (AMA) und den noch spezifischeren gegen die M2-Komponente gerichteten Subtyp, trifft dies auch für 90-100% der hier untersuchten Patienten zu. Bei vier der AMA-positiven PBC-Patienten finden sich ebenfalls erhöhte Werte für das Immunglobulin IgM (vgl. Abbildung 6: E).

Zu den von Hennes et. al (2008) vorgeschlagenen Kriterien für die Diagnose einer AIH gehören in erster Linie erhöhte Titer der Antikörper gegen ANA und SMA (vgl. Abschnitt 1.5.1 *Die Autoimmune*

*Hepatitis*). Aber auch Anti-SLA und Anti-LKM Antikörper fließen in den Diagnosescore mit ein. Bei den AIH-Patienten finden sich in der Mehrzahl der Fälle erhöhte Antikörpertiter gegen ANA und SMA. Bei zwei Patienten sind jeweils Anti-SLA (Patient AIH-9) bzw. Anti-LKM (Patient AIH-12) Antikörper nachweisbar (siehe: Anhang: Tabelle 21).

### 3.2 Der modifizierte histologische Aktivitätsindex (mHAI)

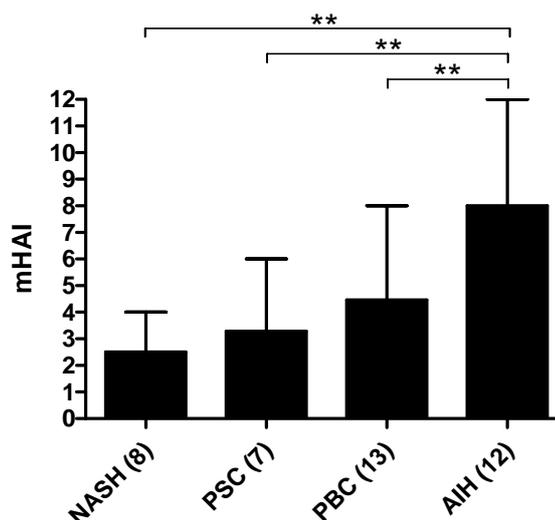
Neben der Interpretation der klinisch-chemischen Parameter kann die entzündliche Aktivität in der Leber histologisch ermittelt werden. Basierend auf den Kriterien des modifizierten Hepatitis Aktivitätsscore (mHAI) erhalten die Gewebeproben der einzelnen Patienten einen Punktwert zwischen 0 und 18 Punkten. Der Punktwert setzt sich zusammen aus den folgenden vier Unterkategorien, die jeweils mit 0 bis 4 bzw. 6 Punkten bewertet werden (Longerich et al. 2008):

- periportale Hepatitis (0-4 Punkte)
- Gruppennekrosen (0-6 Punkte)
- Einzelzellnekrosen (0-4 Punkte)
- portale Entzündung (0-4 Punkte)

Die zum Zeitpunkt der Erstdiagnose der jeweiligen Erkrankung entnommenen Leberbiopsien sind von einem Oberarzt des Instituts für Pathologie (Direktor: Prof. G. Sauter) verblindet nach dem mHAI-Score klassifiziert worden. Die Ergebnisse dieser Auswertung zeigen Tabelle 13 und Abbildung 7.

**Tabelle 13: Bewertung nach dem mHAI-Score**

	n	Median	(range)
NASH	8	2,5	(2-4)
PSC	7	3,0	(2-6)
PBC	13	4,0	(2-8)
AIH	12	8,0	(5-12)



**Abbildung 7: Bewertung nach dem mHAI-Score**

Median + range

mHAI (AIH-PBC  $p < 0,001$ , AIH-PSC  $p < 0,001$ , AIH-NASH  $p < 0,001$ )

Ähnlich wie bei den laborchemischen Parametern, zeigen Patienten der AIH-Gruppe auch im histologischen Grading die höchste entzündliche Aktivität. Sie sind mit einem signifikant höheren mHAI-Score bewertet worden als die Patienten der anderen Gruppen (AIH-PBC  $p < 0,001$ , AIH-PSC  $p < 0,001$ , AIH-NASH  $p < 0,001$ ). Trotz des gleichen Biopsiezeitpunktes (Erstdiagnose) weisen Patienten mit AIH histologisch eine deutlich höhere Entzündungsaktivität auf.

Im Gegensatz zu der leicht erhöhten bzw. häufig normwertigen Aktivität der Transaminasen in der Gruppe der PBC-Patienten zeigen diese in der histologischen Auswertung sowohl im Mittel als auch Absolut die zweithöchste Entzündungsaktivität. Der sichtbare Unterschied zu den NASH- bzw. PSC-Patienten ist nicht signifikant, vor dem Hintergrund der weiteren Beobachtungen jedoch bemerkenswert.

Die klinischen Parameter, laborchemischen Werte und der Antikörperstatus der einzelnen Patienten sind im Anhang dieser Arbeit in Übersichtstabellen dargestellt (vgl. Anhang: Tabelle 20 und Tabelle 21). Des Weiteren zeigt Tabelle 22 im Anhang die patientenbezogenen Ergebnisse des mHAI-Scores und der jeweiligen Unterkategorien.

### 3.3 Qualitative Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen

Bevor die Daten des experimentellen Teils im nächsten Abschnitt präsentiert werden, soll an dieser Stelle eine kurze qualitative Bewertung der immunhistochemischen Ergebnisse vorgenommen werden.

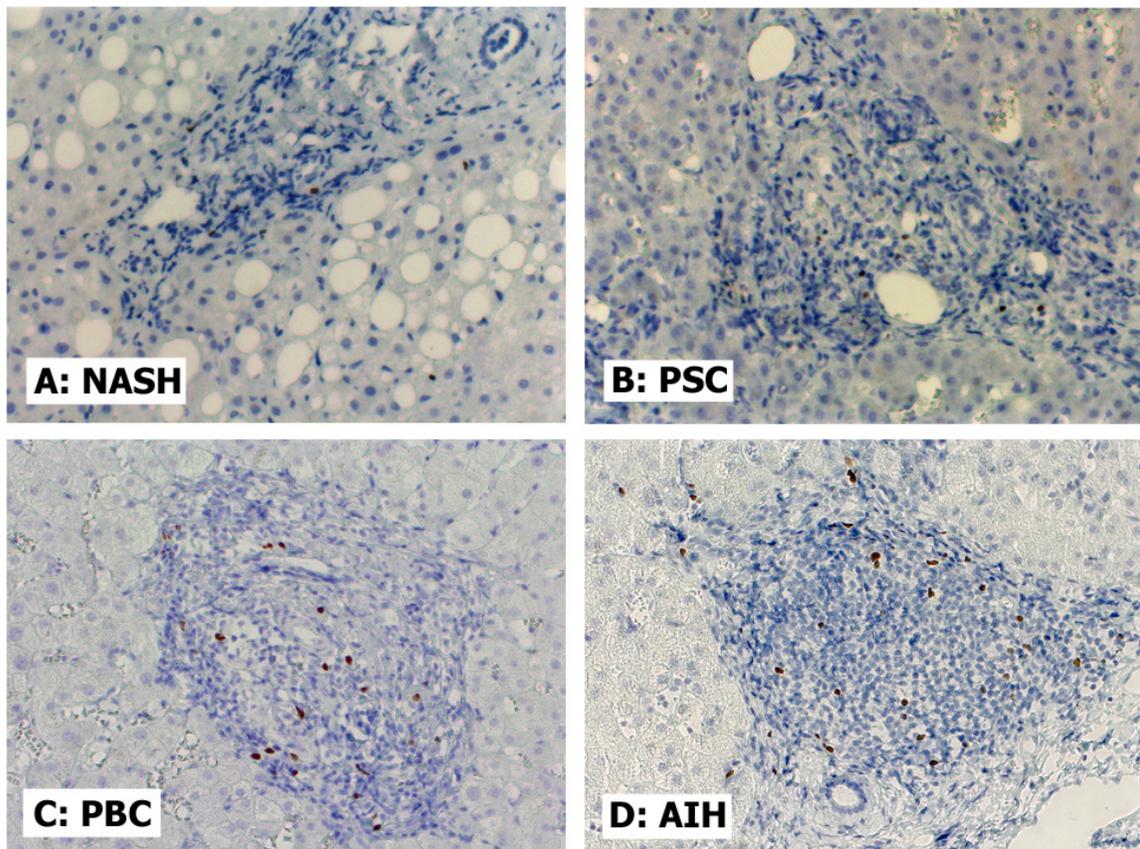
Um optimale Färbeergebnis zu erlangen war teilweise eine Optimierung vorhandener Protokolle notwendig. Im Einzelnen sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen überwiegend

sehr gut. In wenigen Fällen konnte trotz aller Bemühungen kein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden. Diese Fälle werden ebenfalls im Folgenden besprochen.

Vor der Auswertung ist es wichtig zu kontrollieren, dass das Gewebe nach dem Färbevorgang weiterhin intakt ist. Durch die physikalischen Kräfte in der Antigendemaskierung kann es beispielsweise zur Ausbildung von Artefakten oder gar zum Einschmelzen des Gewebes kommen. Erste Hinweise zur Beurteilung des Färbeergebnisses lieferten die positiven und negativen Kontrollfärbungen. Die Identifizierung von unspezifischen Antikörperbindungen und Färbungen im auszuwertenden Schnitt gelang mit histologischen Grundkenntnissen und zunehmender Erfahrung überwiegend problemlos. Des Weiteren trugen der Vergleich mit den bekannten Zell- und Gewebemorphologien, sowie die Antigenverteilung (vgl. Abschnitt 2.2.1 *Immunhistochemie*) zur Reliabilität der Beobachtungen bei.

Bei der Darstellung der Gesamtpopulation CD3<sup>+</sup> T-Zellen und der Population der CD8<sup>+</sup>, zytotoxischen T-Zellen sind die immunhistochemisch positiven Zellen morphologisch gut als Lymphozyten (kleine Zellen mit einem prominenten Zellkern) erkennbar. Unspezifische Antigen-Antikörper-Bindungen sind selten und weichen in Form und Intensität deutlich von positiven Zellen ab. Die Auswertung der Portalfelder und der lobulären Areale gelang problemlos. Eine genaue Betrachtung im Lichtmikroskop und in einigen Fällen mehrmaliges Auszählen ist bei sehr dichten Infiltraten nötig gewesen. Gleiches gilt für die Population der CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen in den Portalfeldern. Im Gegensatz zu den Portalfeldern ist die Auswertung CD4<sup>+</sup> Zellen im Leberläppchenparenchym aufgrund unspezifischer Antigen-Antikörper-Bindungen und regelhafter Reaktion des Antikörpers im Bereich der Sinusoide nicht möglich gewesen (vgl. Abschnitt 4.1.3 *Die Färbung auf CD4*).

Ein Fokus dieser Arbeit liegt in der Betrachtung der regulatorischen Subpopulation der T-Helfer Zellen, den FoxP3<sup>+</sup> Tregs. Zur immunhistochemischen Färbung auf FoxP3 liegen deutlich weniger Erfahrungen und Protokolle vor, als für Antigene die auch in der Routinediagnostik eine große Rolle spielen (beispielsweise CD3 in der Leukämiediagnostik). Nach umfangreichen Vorversuchen ist schließlich, mit dem im Abschnitt 2.2.2 *Durchführung der immunhistochemischen Färbung* beschriebenen Protokoll, ein gutes Färbeergebnis gelungen. Die Zellen sind sowohl im Portalfeld als auch im Läppchen gut diskriminierbar. Unspezifische Färbungen und Artefakte sind deutlich erkennbar. Beispielhaft zeigt Abbildung 8 die immunhistochemische Färbung auf FoxP3 in Portalfeldern der vier untersuchten Erkrankungen.



**Abbildung 8: Immunhistochemie: FoxP3+ Zellen**

Vergrößerung 200x

A: NASH-2, B: PSC-7, C: PBC-13, D: AIH-7

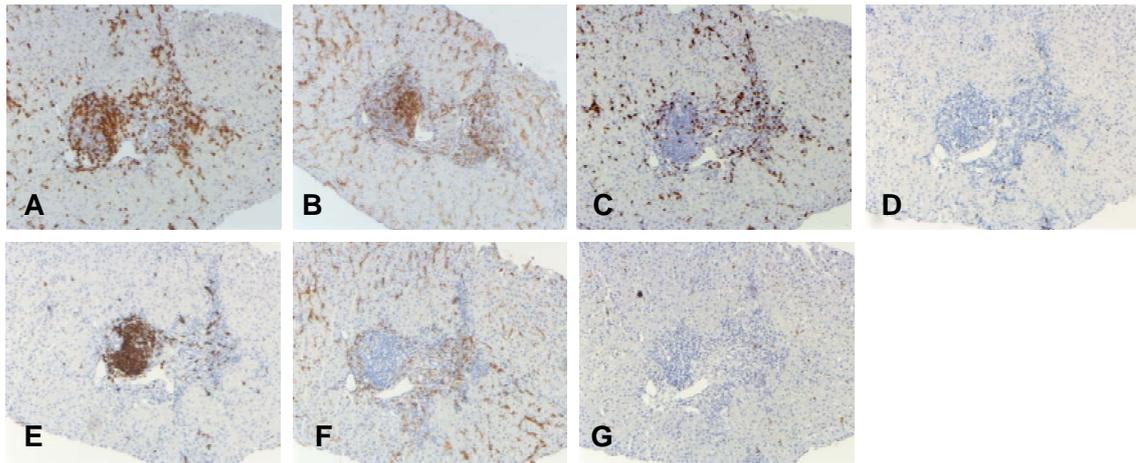
Die B-Zell Färbung auf CD20 zeigt eine erwartungsgemäß membranöse Färbung morphologisch lymphozytärer Zellen. Größe und Form variieren stärker als bei den bereits beschriebenen T-Lymphozytenfärbungen. Die Auswertung gelang in der Mehrzahl der Färbungen problemlos. In einigen Biopsien finden sich dichte Infiltrationen mit vielen positiven Zellen. Dies erforderte erneut eine genaue Betrachtung im Lichtmikroskop und in einigen Fällen mehrmaliges Auszählen.

Die immunhistochemischen Ergebnisse der Zellpopulationen der unspezifischen Immunantwort durch Anfärbung von CD163 (Makrophagen) und MPO (Neutrophile) sind ebenfalls sehr gut. Die Färbung auf CD163 zeigt im Läppchen eine Anfärbung großer, auslaufender Zellen im engen örtlichen Zusammenhang zu den Sinusoiden und entspricht somit der Morphologie von Kupffer-Zellen, den Makrophagen der Leber. In den Portalfeldern ist diese Morphologie weniger deutlich zu erkennen. Die positiven Zellen sind kleiner und vereinzelter, eine auslaufende Form ist jedoch weiterhin erkennbar. MPO+ Zellen zeigen ein typisches, zytoplasmatisches Färbemuster und sind in allen vier Gruppen selten zu beobachten. Die Färbung zeigt darüber hinaus keine weiteren morphologischen Auffälligkeiten.

Bei dem Versuch die NK-T-Zellen durch die Färbung auf CD56 darzustellen, zeigen sich nur sehr unregelmäßig positive Zellen. Viele Schnitte erscheinen vollständig negativ. Neben vereinzelt

morphologisch lymphozytären Zellen ist auch eine Anfärbung von Gallengangsepithelien zu beobachten. Auf die quantitative Auswertung der Färbung auf CD56 wurde aufgrund der unbefriedigenden Ergebnisse verzichtet (vgl. 4.1.2 *Die Färbung auf CD56*):

Abbildung 9 zeigt eine Darstellung aller sieben verwendeter Färbungen in einem Portalfeld mit angrenzendem Gewebe eines Patienten. Ein, wie in E erkennbares, sehr starkes B-Zell Infiltrat ist gelegentlich, jedoch ohne Regelmäßigkeit, beobachtet worden.



**Abbildung 9: Immunhistochemie: Portalfelder in der Übersicht**

Vergrößerung 100x; AIH-7

A: CD3+ T-Zellen, B: CD4+ T-Zellen, C: CD8+ T-Zellen, D: FoxP3+ Zellen, E: CD20+ B-Zellen, F: CD163+ Makrophagen, G: MPO+ Neutrophile

### 3.4 Quantitative Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen

In diesem Abschnitt werden die experimentell gewonnen Ergebnisse der Immunhistochemie dargestellt. Zur besseren Übersichtlichkeit werden die großen Lymphozytenpopulationen der T- und B-Lymphozyten und die untersuchten Zellen der unspezifischen Immunabwehr (Makrophagen und Neutrophile) teilweise gemeinsam besprochen. Detaillierte Angaben der einzelnen Patienten in den verschiedenen Gruppen enthalten Tabelle 23 und Tabelle 24 im Anhang dieser Arbeit. In den graphischen Darstellungen dieses Abschnitts ist, wenn nicht anders beschriftet, stets der Median eingezeichnet.

#### 3.4.1 T-Zell Populationen

##### **Gesamtpopulation der T-Zellen (CD3+), der zytotoxischen T-Zellen (CD8+) und die portale Auswertung der T-Helferzellen (CD4+)**

Die Ergebnisse der Auszählung der Färbungen von CD3, CD8 und CD4 in den Portalfeldern und von CD3 und CD8 im lobulären Lebergewebe zeigt Tabelle 14.

**Tabelle 14: Zellzahlen: CD3 und CD8 portal und lobulär und CD4 portal**

	NASH	PSC	PBC	AIH
CD3 n	8	7	13	12
portal Median	1615,47	1772,28	3685,17	2914,03
Standardfehler	184,99	255,69	414,74	330,98
Minimum	533,05	568,96	1107,41	1488,11
Maximum	2060,14	2810,89	5804,56	5230,34
CD3 n	8	7	13	12
lobulär Median	84,47	97,47	175,20	288,63
Standardfehler	13,61	28,53	20,77	57,91
Minimum	62,89	69,63	105,57	105,76
Maximum	183,90	276,27	339,37	665,65
CD8 n	7	7	13	12
portal Median	811,05	1005,76	1495,87	1845,04
Standardfehler	130,04	178,37	230,56	201,45
Minimum	540,66	259,16	369,27	551,72
Maximum	1464,96	1635,16	3547,19	2910,15
CD8 n	7	7	13	12
lobulär Median	53,91	97,21	112,31	178,57
Standardfehler	14,39	37,42	19,24	61,36
Minimum	22,46	26,95	26,95	93,13
Maximum	130,28	280,64	231,35	724,77
CD4 n	7	5	12	9
portal Median	881,69	612,76	1355,51	1852,66
Standardfehler	190,51	57,51	280,45	465,76
Minimum	387,99	477,24	460,03	1076,28
Maximum	1896,66	819,00	3094,38	5032,63

Die Auszählung der Gesamtpopulation CD3+ T-Zellen bei Erstdiagnose ergibt die mit Abstand höchsten Zellzahlen und entspricht in der Regel einem Vielfachen der CD4+ bzw. CD8+ Subpopulation. Der überwiegende Teil der T-Zell Infiltrate befindet sich in den Portalfeldern. Hier übersteigen die Zellzahlen/mm<sup>2</sup> jene im Leberläppchen teilweise um das 10 bis 20-fache. Dies verleiht den Veränderungen im Portalfeld bei den folgenden Beobachtungen ein besonderes Gewicht.

Mit Ausnahme der PSC-Patienten finden sich annähernd gleich große Zellpopulationen von CD4+ und CD8+ Zellen. Für das lobuläre Leberparenchym lassen sich mangels valider CD4-Färbung allenfalls indirekte Schlüsse zum CD4/CD8-Quotienten ziehen (vgl. Abschnitt 3.3 *Qualitative Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen*). Der Anteil CD4+ T-Zellen an der Gesamtpopulation erscheint hier deutlich geringer.

Zum besseren Vergleich der einzelnen Patientengruppen zeigen Abbildung 10 und Abbildung 11 die portale und lobuläre Verteilung der Gesamtpopulation der T-Zellen (CD3+) und den beiden großen Subpopulationen der zytotoxischen T-Zellen (CD8+) und T-Helferzellen (CD4+) bei Erstdiagnose der jeweiligen Erkrankung. Es sei noch einmal darauf verwiesen, dass die T-Zellinfiltrate

pro mm<sup>2</sup> im lobulären Lebergewebe durchschnittlich um das 10- bis 20-fache kleiner sind als in den Portalfeldern (vgl. Achsenskalierungen).

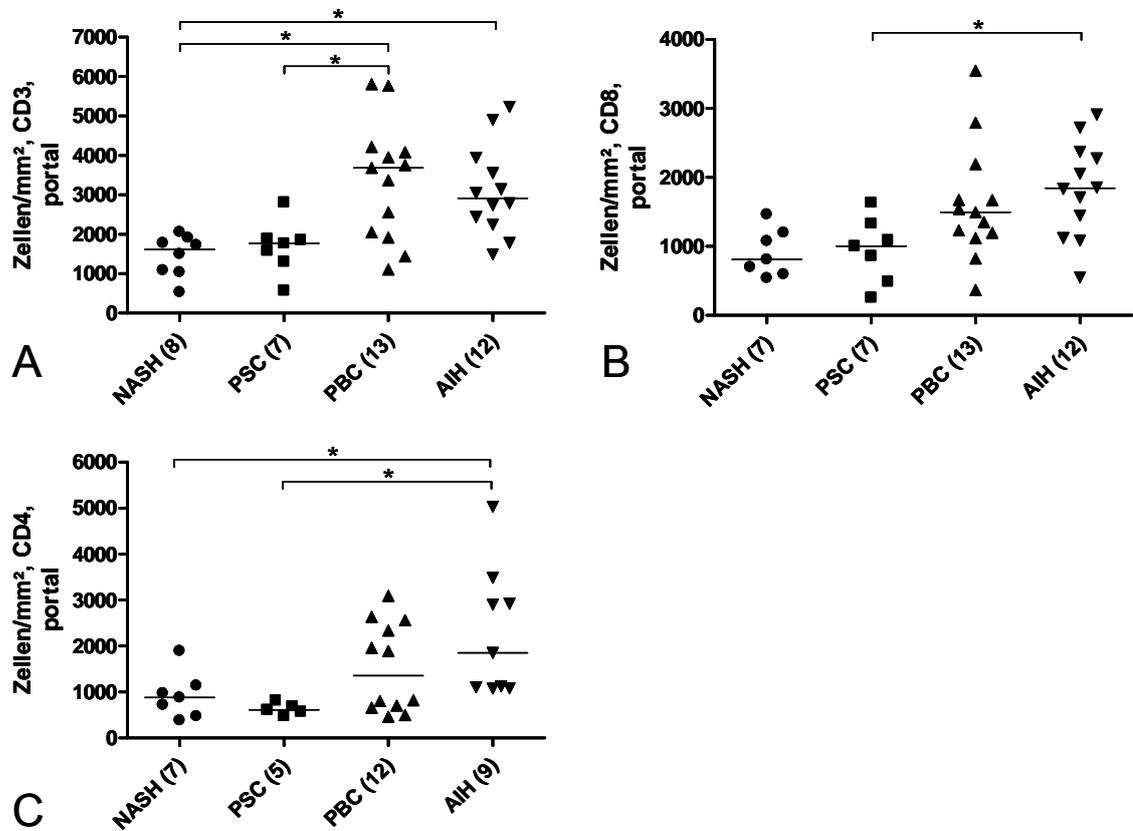
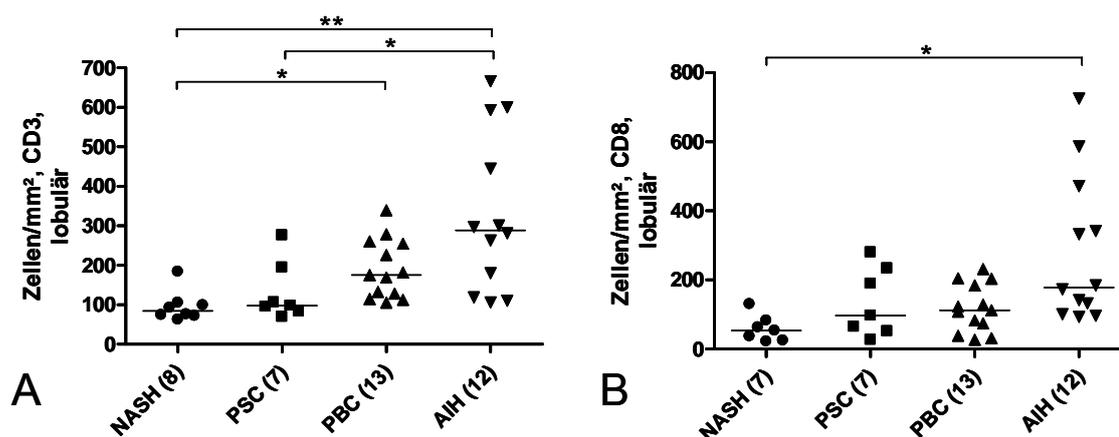


Abbildung 10: Zellzahlen, portal: CD3+, CD8+, CD4+ Zellen

A: Anzahl CD3+ Zellen/mm<sup>2</sup> bei Erstdiagnose (AIH-NASH  $p=0,005$ ; PBC-NASH  $p=0,003$ ; PBC-PSC  $p=0,02$ )

B: Anzahl CD8+ Zellen/mm<sup>2</sup> bei Erstdiagnose (AIH-PSC  $p=0,04$ )

C: Anzahl CD4+ Zellen/mm<sup>2</sup> bei Erstdiagnose (AIH-NASH  $p=0,03$ ; AIH-PSC  $p=0,001$ )



**Abbildung 11: Zellzahlen, lobulär: CD3+, CD8+ Zellen**

A: Anzahl CD3+ Zellen/mm<sup>2</sup> bei Erstdiagnose (AIH-NASH  $p < 0,001$ ; AIH-PSC  $p = 0,006$ ; PBC-NASH  $p = 0,03$ )

B: Anzahl CD8+ Zellen/mm<sup>2</sup> bei Erstdiagnose (AIH-NASH  $p = 0,001$ )

Bereits bei den laborchemischen Parametern und dem histologischen Grading fällt die erhöhte entzündliche Aktivität der an einer AIH erkrankten Patienten auf. In der quantitativen Auswertung des entzündlichen Infiltrats der T-Lymphozyten zeigen sich zum Zeitpunkt der Erstdiagnose in der AIH-Gruppe die höchsten Zellzahlen. Im Vergleich zur NASH-Gruppe weisen AIH-Patienten in den Portalfeldern eine signifikant höhere Anzahl an CD3+ und CD4+ Zellen auf. Ebenso sind im Vergleich zur PSC-Gruppe die portal erhöhten Zellzahlen der CD4+ und CD8+ Zellen signifikant. Die lobulären Auswertung ergibt bei den AIH-Patienten eine signifikant erhöhte Anzahl CD8+ Zellen im Vergleich zu den Patienten der NASH-Gruppe. Im Vergleich zu den PSC-Patienten sind die Unterschiede sowohl bei der CD3, als auch bei der CD8 Färbung signifikant.

Analog zu den Ergebnissen des histologischen Gradings (vgl. Abschnitt 3.2 *Der modifizierte histologische Aktivitätsindex (mHAI)*) finden sich die zweitstärksten Infiltrate überwiegend in der Gruppe der PBC-Patienten. Die Anzahl der CD3+, CD4+ und CD8+ Zellen ist portal gegenüber den NASH und PSC-Patienten erhöht. Signifikant ist dieser Unterschied bei den CD3+ Zellen. Im Leberläppchen zeigt sich eine ähnliche Tendenz mit einer signifikant erhöhten Anzahl CD3+ Zellen gegenüber den NASH-Patienten.

### FoxP3+ regulatorische T-Zellen

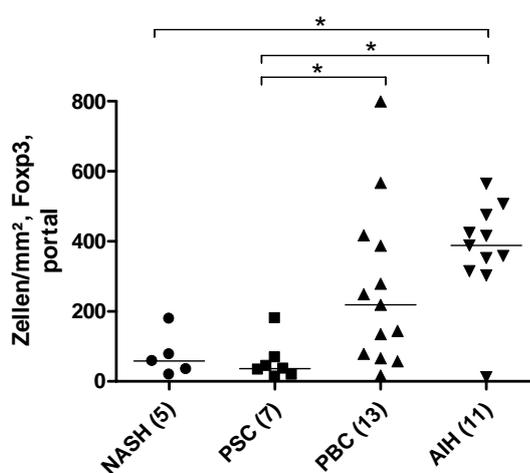
In der Untersuchung FoxP3+ regulatorischer T-Zellen liegt ein besonderer Schwerpunkt dieser Arbeit. Aktuelle Hypothesen zur Bedeutung von regulatorischen T-Zellen bei autoimmunen Hepatopathien wurden bereits im Abschnitt 1.4 *Regulatorische T-Zellen (Tregs)* erläutert. Im Gegensatz zu aktuellen Veröffentlichungen anderer Autoren wird in dieser Arbeit eine erhöhte Anzahl der regulatorischen, FoxP3+ T-Zellen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose in der Gruppe der AIH- und PBC-Patienten beobachtet (vgl. Abschnitt 4 *Diskussion*, (Longhi et al. 2004; Longhi et al. 2006)). Die

absoluten Zahlen weisen Tregs als kleine T-Zell-Subpopulation aus. Der rechnerische Anteil an der Gesamtpopulation der CD3+ T-Zellen beträgt in allen Gruppen portal ca. 8% (n=36), (NASH 5%, PSC 3%, PBC 8% und AIH 12%).

Die Daten zur Auszählung der FoxP3+ Zellen bei Erstdiagnose zeigen Tabelle 15, Abbildung 12 und Abbildung 13.

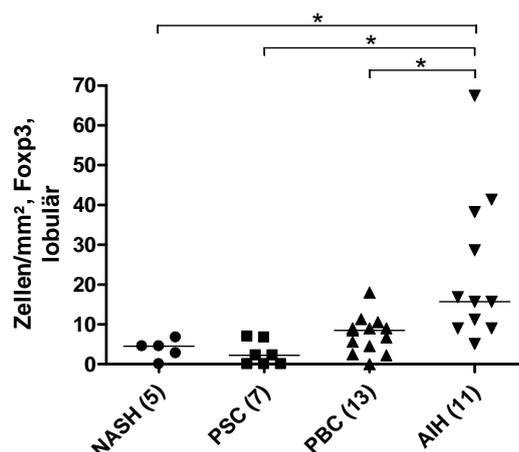
**Tabelle 15: Zellzahlen: FoxP3**

	NASH	PSC	PBC	AIH
Foxp3 n	5	7	13	11
portal Median	58,30	36,28	219,19	388,22
Standardfehler	28,09	21,69	63,43	43,60
Minimum	19,39	13,39	16,82	12,20
Maximum	178,97	180,10	799,79	565,11
Foxp3 n	5	7	13	11
lobulär Median	4,49	2,25	8,51	15,72
Standardfehler	1,12	1,16	1,30	5,69
Minimum	0,00	0,00	0,00	5,08
Maximum	6,74	6,97	17,97	67,38



**Abbildung 12: Zellzahl, portal: FoxP3+ Zellen**

Anzahl FoxP3+ Zellen/mm<sup>2</sup> bei Erstdiagnose (AIH-NASH p=0,03; AIH-PSC p=0,002; PBC-PSC p=0,03)



**Abbildung 13: Zellzahl, lobulär: FoxP3+ Zellen**

Anzahl FoxP3+ Zellen/mm<sup>2</sup> bei Erstdiagnose (AIH-NASH  $p=0,002$ ; AIH-PSC  $p=0,005$ ; AIH-PBC  $p=0,02$ )

Die regulatorischen T-Zellen befinden sich ebenfalls zum überwiegenden Teil im entzündlichen Infiltrat der Portalfelder. Im Vergleich zu den Zellzahlen im Leberläppchen finden sich portal 12- bis 25-fach höhere Zellzahlen. Die AIH-Patienten zeigen in den Portalfeldern und im Leberläppchen signifikant höhere Zellzahlen als die Patienten aus der NASH- und PSC-Gruppe. Auch die PBC-Patienten zeigen ein großes Infiltrat. In den Portalfeldern ist diese Erhöhung im Vergleich zu den PSC-Patienten signifikant. Im lobulären Leberparenchym zeigt sich eine ähnliche Tendenz.

### 3.4.2 B-Zellen

Neben den beschriebenen Gruppen von T-Zellen stellen die B-Lymphozyten die zweite große Population im lymphozytären Infiltrat dar. Die Ergebnisse der Färbung und Auszählung dieser CD20+ Zellen zeigen Tabelle 16 und die Abbildungen 14 und 15.

**Tabelle 16: Zellzahlen: CD20**

	NASH	PSC	PBC	AIH
CD20 n	8	7	13	12
portal Median	362,09	38,58	662,61	1620,69
Standardfehler	39,37	45,53	224,55	320,70
Minimum	185,36	29,16	0,00	106,13
Maximum	519,37	347,55	2541,29	4203,44
CD20 n	8	7	13	12
lobulär Median	11,23	15,72	12,37	12,89
Standardfehler	2,14	2,92	2,22	4,43
Minimum	0,00	7,01	4,53	0,00
Maximum	16,13	24,76	35,94	51,99

Auch bei der Betrachtung der CD20+ B-Lymphozyten zeigt sich, dass Patienten der AIH- und PBC-Gruppe zum Zeitpunkt der Erstdiagnose teilweise um ein Vielfaches höhere Zellzahlen/mm<sup>2</sup>

aufweisen, als die Patienten der PSC- oder NASH-Gruppen. Wie bereits bei den T-Zell Populationen finden sich die absolut höchsten Werte in der AIH-Gruppe. In den Portalfeldern ist der Unterschied zwischen den hohen Zellzahlen der AIH-Patienten und niedrigen Zellzahlen der PSC- und NASH-Patienten signifikant. Im portalen Lebergewebe befindet sich ein deutlich dichteres Infiltrat an CD20+ Zellen als in der Peripherie, es finden sich hier bis zu 124-fach höhere Zellzahlen, als im lobulären Lebergewebe. Auffällig sind die niedrigen Zellzahlen in der Gruppe der PSC-Patienten. Hier übersteigt das Infiltrat in den Portalfeldern jenes im Läppchen durchschnittlich nur 2,5-fach. Besonders im portalen Lebergewebe weisen die erhobenen Daten jedoch auch eine größere Streuung auf, als beispielsweise die Population der CD3+ T-Zellen.

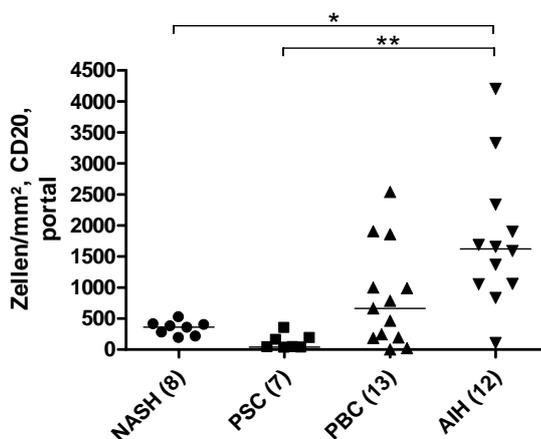


Abbildung 14: Zellzahl, portal: CD20+ Zellen

Anzahl CD20+ Zellen/mm² bei Erstdiagnose (AIH-NASH p=0,03; AIH-PSC p<0,001)

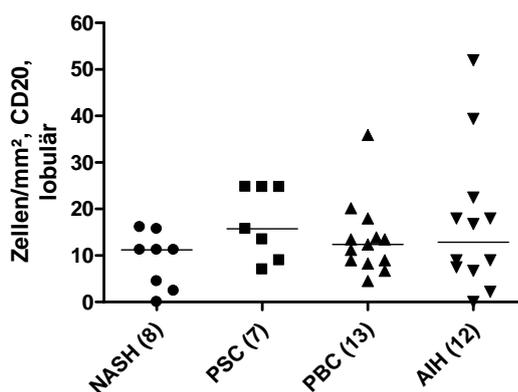


Abbildung 15: Zellzahl, lobulär: CD20+ Zellen

Anzahl CD20+ Zellen/mm² bei Erstdiagnose (ns)

### 3.4.3 Zellen der unspezifischen Immunantwort

Zum Abschluss der immunhistochemischen Auswertung erfolgt die Auszählung der CD163+ Makrophagen und Kupffer-Sternzellen, sowie der MPO+ neutrophilen Zellen bei Erstdiagnose der jeweiligen Erkrankung – den beiden großen Zellpopulationen der unspezifischen Immunantwort. Tabelle 17 enthält die Ergebnisse der Auszählung der CD163+ und MPO+ Zellpopulationen. Abbildung 16 und Abbildung 17 geben eine graphische Übersicht über die Zahlen und Analysen.

**Tabelle 17: Zellzahlen: CD163 und MPO**

	NASH	PSC	PBC	AIH
CD163 n	7	7	13	12
portal Median	657,20	330,19	1110,29	1517,11
Standardfehler	167,15	92,52	161,37	139,90
Minimum	236,45	115,94	275,06	1006,05
Maximum	1534,96	719,80	2532,48	2468,44
CD163 n	8	7	13	12
lobulär Median	375,92	503,13	729,99	777,16
Standardfehler	22,76	66,29	55,36	45,50
Minimum	308,30	397,56	352,62	544,09
Maximum	476,09	908,07	963,59	1000,62
MPO n	8	7	13	12
portal Median	35,79	40,80	74,76	175,34
Standardfehler	27,01	44,63	20,55	37,07
Minimum	0,00	0,00	0,00	17,76
Maximum	208,95	330,76	235,97	362,68
MPO n	8	7	13	12
lobulär Median	22,97	26,95	45,15	46,05
Standardfehler	7,70	13,52	5,52	7,39
Minimum	11,23	4,58	15,72	26,00
Maximum	69,63	106,15	74,37	101,05

Die CD163+ Makrophagen und Kupffer-Sternzellen zeigen sich ähnlich vermehrt wie die lymphozytären Zellpopulationen. Die höchsten Zellzahlen sowohl in den Portalfeldern, als auch im lobulären Leberparenchym finden sich erneut bei den Patienten der AIH-Gruppe. Die Unterschiede zu den portalen Zellzahlen der NASH- und PSC-Patienten sind signifikant. Auch Patienten mit PBC weisen höhere Zellzahlen in den Portalfeldern auf. Diese sind im Vergleich zu den Patienten mit PSC signifikant erhöht. Bei der vergleichenden Analyse der CD163+ Zellen zeigen die PSC-Patienten die niedrigsten Zellzahlen/mm<sup>2</sup>, im Vergleich zu den anderen drei Patientengruppen sind sie signifikant erniedrigt. Das Verhältnis der Zellzahlen in den Portalfeldern im Vergleich zum Leberläppchen ist deutlich niedriger als bei den lymphozytären Infiltraten. Es beträgt im Durchschnitt maximal 1:1,9 und ist im Falle der PSC-Patienten sogar zu höheren Werten im lobulären Lebergewebe verschoben (1:0,6).

Die Auswertung der MPO+ neutrophilen Zellen ergibt ein sehr uneinheitliches Bild. In der Tendenz lassen sich auch hier die höchsten Zellzahlen pro mm<sup>2</sup> in der Gruppe der AIH-Patienten beobachten. Die Werte unterliegen jedoch einer starken Streuung. Bemerkenswert ist ein kleines Verhältnis des lobulären zum portalen Infiltrat.

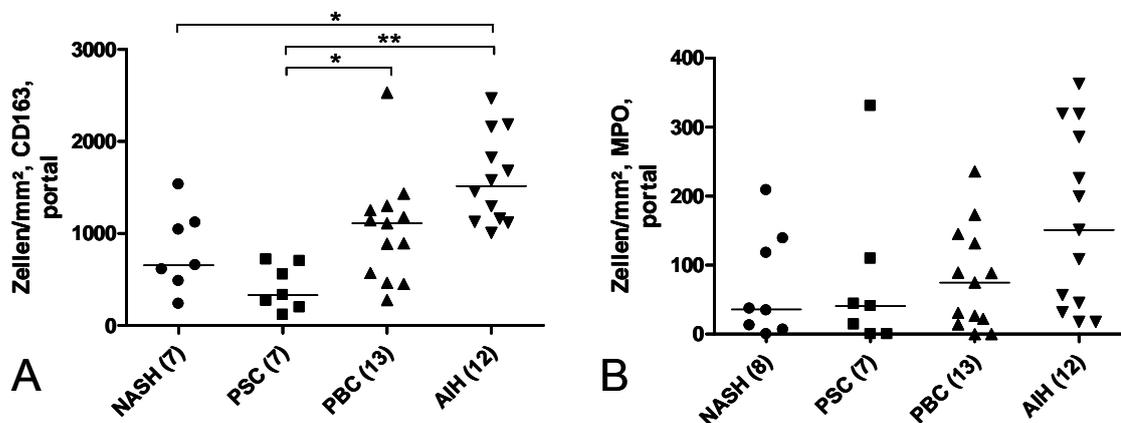


Abbildung 16: Zellzahlen, portal: CD163+ und MPO+ Zellen

A: Anzahl CD163+ Zellen/mm<sup>2</sup> bei Erstdiagnose (AIH-NASH p=0,03; AIH-PSC p<0,001; PBC-PSC p=0,004)

B: Anzahl MPO+ Zellen/mm<sup>2</sup> bei Erstdiagnose (ns)

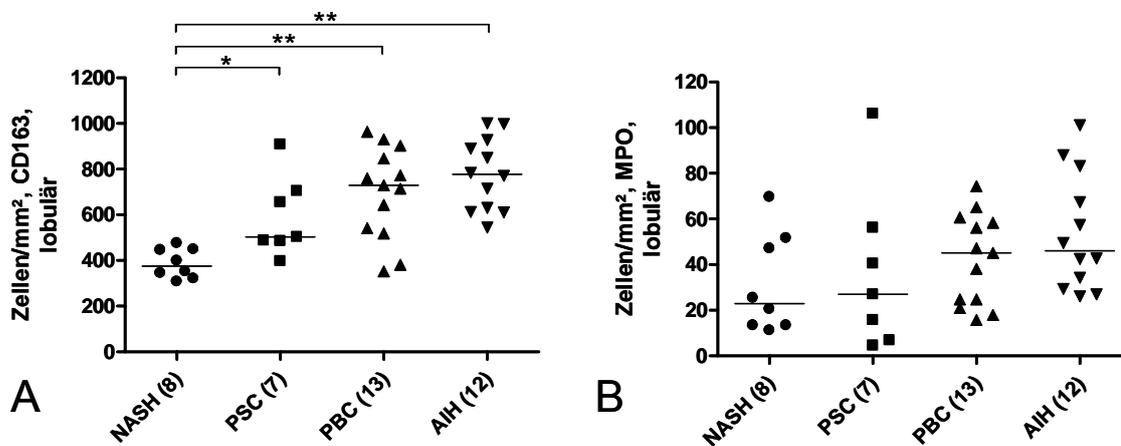


Abbildung 17: Zellzahlen, lobulär: CD163+ und MPO+ Zellen

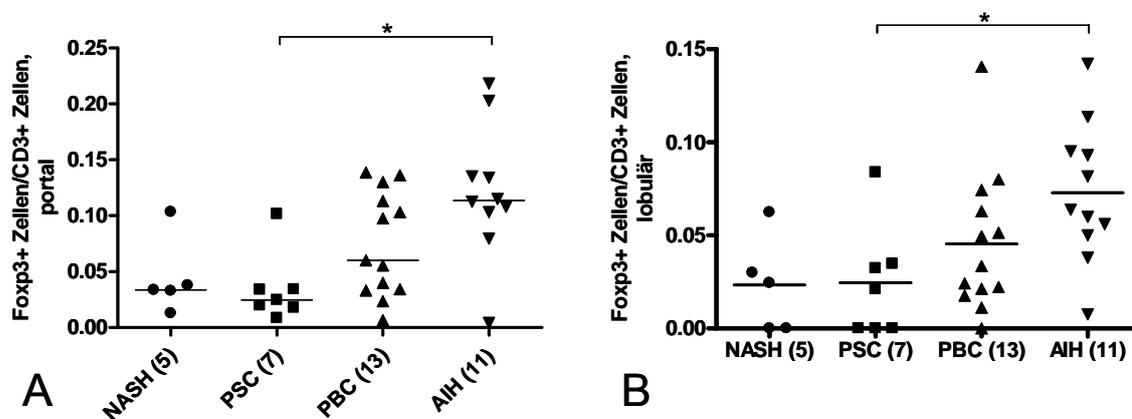
A: Anzahl CD163+ Zellen/mm<sup>2</sup> bei Erstdiagnose (AIH-NASH p<0,001; PBC-NASH p<0,001; PSC-NASH p=0,03)

B: Anzahl MPO+ Zellen/mm<sup>2</sup> bei Erstdiagnose (ns)

### 3.4.4 Regulatorische T-Zellen im Vergleich zu übergeordneten Zellpopulationen

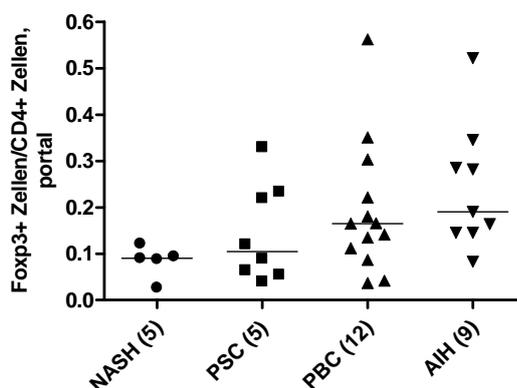
In den vorangehenden Abschnitten ist gezeigt worden, dass auch die Anzahl der FoxP3+ Tregs mit zu der Zunahme der histologischen Entzündungsaktivität (mHAI-Score) ansteigt. Da die Ur-

sprungpopulationen der Tregs, die CD4+ T-Helferzellen bzw. deren ursprüngliche Population, die Gesamtheit CD3+T-Zellen, ebenfalls ansteigen, ist hier untersucht worden, wie sich das statistische Verhältnis der FoxP3+ Zellen zu diesen beiden übergeordneten Populationen innerhalb der verschiedenen Patientengruppen verhält. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose ist bei Patienten mit einem Krankheitsbild, welches durch erhöhte Entzündungsaktivität gekennzeichnet ist (AIH, vgl. Abschnitt 3.2 *Der modifizierte histologische Aktivitätsindex (mHAI)*) die Zahl der FoxP3+ Tregs nicht nur absolut, sondern auch im Verhältnis zur Gesamtzahl der CD3+ Zellen signifikant höher als bei Patienten mit einem Krankheitsbild niedriger Entzündungsaktivität (PSC) (vgl. Abbildung 18). Diese Tendenz zeigt sich ebenfalls im Verhältnis zu CD4+ Zellen und im Vergleich zur NASH-Gruppe, ist dort jedoch nicht signifikant (vgl. Abbildung 19).



**Abbildung 18: Verhältnis FoxP3+ Zellen zu CD3+ T-Zellen**

A: FoxP3+/CD3+ Zellen, portal (AIH-PSC p=0,04)  
 B: FoxP3+/CD3+ Zellen, lobulär (AIH-PSC p=0,04)



**Abbildung 19: Verhältnis FoxP3+ Zellen zu CD4+ T-Zellen im Portalfeld**

(ns)

Auch Patienten mit der Diagnose einer PBC weisen ein erhöhtes Verhältnis FoxP3+ zu CD3+ T-Zellen auf. Erneut verhält sich das Infiltrat der Entzündungszellen bei den PBC-Patienten in der

Tendenz sehr ähnlich zu den AIH-Patienten. Die im Verhältnis zu CD3+ Zellen erhöhte FoxP3+ Treg Anzahl findet sich sowohl im lobulären Lebergewebe, als auch in den Portalfeldern. Obwohl die absoluten Zellzahlen im Portfeld jene im Leberläppchen um das bis zu 25-fache übersteigen, zeigt sich beim rechnerischen Verhältnis in beiden Loci ein verhältnismäßig konstanter Korridor zwischen 0,02 und 0,2 (Mittel: 0,07) FoxP3+ Tregs pro CD3+ T-Zelle.

### 3.5 Korrelative Betrachtungen

In den vorangehenden Abschnitten ist gezeigt worden, dass die Anzahl der Tregs bei Patienten, die an AIH oder PBC erkrankt sind, in vielen Fällen signifikant höher ist als bei den Patienten der PSC- oder NASH-Gruppe. Weitere Unterschiede in den Zellpopulationen und laborchemischen Charakteristika sind bereits herausgearbeitet worden. Eine gemeinsame Betrachtung der erhobenen Parameter aller vier Patientengruppen erscheint daher nicht sinnvoll. Auch die unterschiedlichen Pathogenesen und bisher bekannten autoimmunen Charakteristika lassen eine gemeinsame Betrachtung von PSC, PBC und AIH als gleichberechtigte Beispiele autoimmuner Hepatopathien nicht zu. Bisher konnte gezeigt werden, dass viele erhobene Parameter der Patienten mit PBC und AIH sich ähnlich verhalten, wenn auch die entzündliche Aktivität der AIH-Patienten insgesamt etwas höher zu sein scheint. Vor diesem Hintergrund werden bei der Zusammenschau der bisher untersuchten Parameter mittels Korrelationsanalysen nur die Patienten mit den autoimmunen Lebererkrankungen PBC und AIH (n=25) gemeinsam betrachtet.

Es kann gezeigt werden, dass zum Zeitpunkt der Erstdiagnose die Anzahl der FoxP3+ Tregs mit Zunahme der histologischen Entzündungsaktivität (mHAI-Score) ansteigt. Wie bei einer Subpopulation zu erwarten findet sich ebenfalls ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Ursprungspopulationen der CD3+ und CD4+ Zellen.

**Tabelle 18: Korrelationsanalyse der FoxP3+ Tregs im Portalfeld (Lobulär)**

	mHAI	CD3	CD4	
Foxp3	0,42 (0,50)	0,56 (0,61)	0,56	Korrelationskoeffizient nach Pearson
	0,039 (0,012)	0,004 (0,002)	0,008	p
	24 (24)	24 (24)	21	n

An dieser Stelle soll ergänzend kurz erwähnt sein, dass sich zwischen jenen Laborwerte die dem Kliniker einen Leberschaden anzeigen und dem mHAI-Score in der statistischen Analyse ebenfalls Zusammenhänge finden lassen. Daten hierzu zeigt Tabelle 19 *Korrelationsanalyse des mHAI im Vergleich zu den klinischen Parametern*. Für die Eingangs beschriebenen Diskrepanzen zwischen mHAI und Transaminasen in der Gruppe der PSC-Patienten vgl. Abschnitt 4.2.3 *Patienten mit Primär Sklerosierender Cholangitis*.

**Tabelle 19: Korrelationsanalyse des mHAI im Vergleich zu den klinischen Parametern**

	GOT	GPT	Bilirubin	IgG	
mHAI	0,59	0,55	0,58	0,40	Korrelationskoeffizient nach Pearson
	0,002	0,004	0,002	0,049	p
	25	25	25	25	n

## 4 Diskussion

### 4.1 Bewertung der Immunhistochemie

Beim Studium der im Abschnitt 4.2 *Ergebnisse der Patientengruppen* erläuterten immunhistochemischen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zeigt sich, dass diese untereinander sehr schwer vergleichbar sind. Sasaki et al. nehmen beispielsweise eine semiquantitative Eingruppierung vor. Sie klassifizieren das Infiltrat anhand der FoxP3+ Zellen pro Portalfeld als „schwach: 0-3“, „mittel: 4-10“, „stark: >10“ (Sasaki et al. 2007). Dies macht einen detaillierten Vergleich schwierig und erlaubt, gerade bei großen Infiltraten, keine genauere Differenzierung. In dieser Untersuchung wurden beispielsweise bis zu 110 FoxP3+ Zellen in einem Portalfeld gezählt (Patient: PBC-8). Bei anderen Autoren finden sich prozentuale Angaben der Verhältnisse von Tregs zu Monozyten (Sakaki et al. 2008) oder anderen T-Zell Populationen wie beispielsweise CD3+ oder CD8+ T-Zellen (Lan et al. 2006). Bisher hat sich keine etablierte Methode zur Auswertung durchgesetzt. In Zukunft ist die Entwicklung eines Auswertungsstandards wünschenswert. Die absolute oder auch prozentuale Darstellung von Zellpopulationen hat hier gegenüber semiquantitativen Methoden den Vorteil der größeren Genauigkeit und besseren Vergleichbarkeit. Die verschiedenen Lokalisationen und auch absolute Infiltratgrößen sollten berücksichtigt werden. Die detaillierten Angaben zur Lokalisation und zum histologischen Entzündungsprozess sind Vorteile der Immunhistochemie und führten zur Wahl der Methode für die Untersuchungen in dieser Arbeit. Sie ergänzen die rein quantitative Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse und die Bestimmung der funktionellen Aktivität durch *in vitro* assays. Beide Methoden wurden in unserer Arbeitsgruppe ebenfalls durchgeführt (vgl. Peiseler et al. 2012). Die folgenden Abschnitte berichten von bemerkenswerten Aspekten einzelner Färbungen und Patientengruppen.

#### 4.1.1 Der Treg-Phänotyp und FoxP3

Die Qualität von FoxP3 als Treg Marker im Menschen ist noch nicht abschließend geklärt. Zum einen stellt sich die Frage, ob FoxP3 nur von regulatorischen T-Zellen exprimiert wird und somit, wie in der Maus, einen spezifischen Treg Marker darstellt. Zum anderen gibt es Hinweise auf weitere regulatorische Zellpopulationen, welche möglicherweise kein Foxp3+ exprimieren (vgl. Abschnitt 1.4 *Regulatorische T-Zellen (Tregs)*).

Im Gegensatz zu den CD4+ CD25- T-Zellen der Maus, ist im Menschen eine vermehrte FoxP3 Expression nach Aktivierung konventioneller CD4+ CD25- T-Zellen beschrieben (Walker et al. 2003; Gavin et al. 2006). Weiter ist auch eine Expression in CD8+ T-Zellen und CD8+CD28- Suppressor-Zellen nachgewiesen (Manavalan et al. 2004; Xystrakis et al. 2004). Diese kürzlich beschriebenen CD8+CD28- Tregs (Smith und Kumar 2008) scheinen bei autoimmunen Hepato-

pathien nur eine geringe Rolle zu spielen. Ferri et al. (2010) konnten bei AIH-Patienten keine Unterschiede in der Anzahl CD8+CD28- Tregs feststellen. Sasaki et al. (2007) berichten im Vorfeld ihrer Untersuchungen zu FoxP3+ T-Zellen in der Leber, dass diese überwiegend CD4+ und in keinem Fall CD8+ waren. Die möglicherweise suppressive Rolle der kürzlich beschriebenen  $\gamma\delta$ -T-Zellen (Girardi 2005) und Th17-Zellen (Harrington et al. 2005) ist in dieser Arbeit nicht untersucht worden.

Sakaguchi et al. geben in einer ihrer Arbeiten einen Überblick über die phänotypische und funktionelle Diversität von humanen Tregs. Es sind zwei Hauptisoformen von FoxP3 identifiziert, welche allerdings beide bei starker Expression eine suppressive Aktivität induzieren können. Die Autoren schlagen für naive und ruhende Treg-Zellen einen charakteristischen Phänotyp mit geringer Foxp3 Expression vor (Foxp3<sub>low</sub> CD45RA+ CD45RO- CD127<sub>low</sub> CD25<sup>high</sup>) und beschreiben FoxP3 als einen Marker für Effektor Tregs (CD45RA- CD45RO+ FOXP3<sup>high</sup>) und für aktivierte, konvertierte Treg-ähnliche T-Zellen (FoxP3<sub>low</sub> CD45RA- CD4+) (Miyara et al. 2009b; Sakaguchi et al. 2010). Die aktivierten, Treg-ähnliche Zellen (FoxP3<sub>low</sub> CD45RA- CD4+) können den im Abschnitt 1.4 *Regulatorische T-Zellen (Tregs)* beschriebenen iTregs (Chen et al. 2003; Huber et al. 2009) entsprechen. Inwieweit die beschriebenen Populationen mit einer geringen FoxP3 Expression (Foxp3<sub>low</sub>) in der Immunhistochemie dargestellt werden ist unklar. Ebenfalls gibt es bisher keine ausreichende Charakterisierung der verschiedenen FoxP3+ Zellpopulationen in der Leber.

Trotz dieser Einschränkungen scheint FoxP3 im Menschen nach wie vor ein sehr guter Marker für die Darstellung ausgereifter Tregs zu sein. Verschiedene Arbeitsgruppen sehen in einer hohen FoxP3 Expression einen spezifischen Marker für Tregs (Fontenot et al. 2003; Hori et al. 2003; Khattri et al. 2003). In einer Arbeit von Oo et al. (2010b) wurden Tregs im Lebergewebe sowohl mittels Durchflußzytometrie (Färbung auf CD4+ CD25+ CD127<sub>low</sub> FoxP3+) als auch mittels Immunhistochemie (Färbung auf FoxP3+) dargestellt. Die ermittelten Zellzahlen zeigten keinen signifikanten Unterschied. Die Mehrheit der FoxP3+ Zellen waren CD4+ CD25+ CD127<sub>low</sub> Zellen (Oo et al. 2010b). Auch die gemeinsame Betrachtung der Daten dieser Arbeit und durchflußzytometrischen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe lassen vermuten, dass es sich bei immunhistochemisch FoxP3+ Zellen auch um Tregs und nicht um aktivierte T-Zellen handelt. Bei der Analyse von Blutproben war der Anteil der FoxP3+ CD127<sup>high</sup> Effektorzellen gemessen an der Gesamtheit FoxP3+ Zellen kontinuierlich unter 5% (Peiseler et al. 2012).

#### 4.1.2 Die Färbung auf CD56

Wie bereits im Abschnitt 3.3 *Qualitative Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen* erwähnt, ist es nicht gelungen eine befriedigende immunhistochemische Darstellung der CD56+ Zellen im Leberparenchym zu erhalten. Wäre es gelungen mit dieser Färbung die Gesamtpopulation der NK-Zellen darzustellen, hätte eine zusätzliche Darstellung der NKT-Zell Subpopulation interessante Hinweise auf die Verteilung dieser Zellen bei unterschiedlichen autoimmunen Hepatopathien liefern können.

Neben vereinzelt morphologisch lymphozytären Zellen ist auch eine Anfärbung von Gallengangsepithelien beobachtet worden, welche bei Patienten mit extrahepatischer Gallengangsatriese auch bereits von anderen Autoren beschrieben ist (Torbenso et al. 2003; Mahjoub et al. 2008). Weitere Protokolloptimierungen können zwar Sensitivität und Spezifität der Immunhistochemie verbessern, jedoch nicht die Koexpression mehrerer im Gewebe vorhandener Strukturen verändern, so dass dieses Oberflächenprotein in der Leber keinen geeigneten Marker für NK-Zellen darzustellen scheint.

#### 4.1.3 Die Färbung auf CD4

Neben den T-Helfer-Zellen exprimieren auch Monozyten im peripheren Blut und Gewebemakrophagen das CD4 Molekül (Zola 2007). Das beobachtete Färbemuster in dieser Arbeit entspricht am ehesten Endothel- und/oder Kupffer-Zellen. Trotz des Einsatzes verschiedener Antikörper und diversen Protokolloptimierungen konnte im Leberläppchen kein auswertbares Ergebnis erzielt werden, so dass die Färbung auf das CD4 Antigen im Bereich der Leberläppchen ebenfalls nicht ausgewertet wurde (vgl. Abschnitt 3.3 *Qualitative Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen*). In den Portalfeldern war das Abgrenzen der positiven Zellen schwieriger, als beispielsweise bei der Färbung auf CD3. Bei insgesamt sechs Patienten ließ sich trotz wiederholter Färbeversuche und dem Einsatz verschiedener Antikörper kein auswertbares Ergebnis im Portalfeld erzielen (vgl. Abschnitt 3.4.1 *T-Zell Populationen*). Ob das CD4-Antigen im Lebergewebe besonders anfällig ist oder die optimale (Vor-)Behandlung nicht ausgemacht werden konnte, lässt sich nicht abschließend beantworten.

#### 4.1.4 Die NASH-Patienten

Die Zellzahl der NASH-Patienten im lobulären Leberparenchym ist mit einem natürlichen Artefakt belegt. In den lobulären Parenchymzellen der NASH-Patienten finden sich regelhaft Fettvakuolen, welche einen Teil der vermessenen Fläche ausmachen. Wie im Abschnitt 2.2.3.1 *Quantitative Auswertung* beschrieben, wurden zell- und parenchymfreie Areale wie beispielsweise Gefäßlumina bei der Berechnung der ausgewerteten Fläche berücksichtigt. Dies ist bei den intrazellulären und infiltratfreien Fettvakuolen der NASH-Patienten nicht vorgenommen worden. Möglicherweise ist es hierdurch zu einer Unterschätzung des lobulären Entzündungsinfiltrats bei den NASH-Patienten gekommen.

## 4.2 Ergebnisse der Patientengruppen

Mit der immunhistochemischen Charakterisierung der Immunantwort bei der Erstdiagnose von Leber- und Gallenwegserkrankungen mit einer autoimmunen Genese, insbesondere in Hinblick auf FoxP3+ regulatorische T-Zellen, ist ein wichtiges Ziel dieser Arbeit erreicht worden. Die statistischen Analysen haben Unterschiede zwischen den verschiedenen Patientengruppen aufgezeigt. Die

Erhebung der klinischen und histologischen Daten ermöglicht eine umfangreiche Analyse und Einordnung der gewonnenen Daten in das klinische Bild. Im Folgenden werden die Ergebnisse in Bezug auf die vier Patientengruppen zusammengefasst und diskutiert. Jeweils zum Ende eines jeden Abschnitts erfolgt die gesonderte Darstellung der Rolle der Foxp3<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen in der jeweiligen Erkrankung.

#### 4.2.1 Patienten mit autoimmuner Hepatitis

Die AIH-Patienten (n=12) zeigten in der laborchemischen Charakterisierung bei Erstdiagnose die höchsten Transaminasen-Werte und auch eine deutliche IgG-Erhöhung. In der histologischen Beurteilung zeigte sich bei Erstdiagnose, übereinstimmend mit den laborchemischen Befunden, eine signifikant stark erhöhte Entzündungsaktivität (mHAI) gegenüber den anderen untersuchten Patientengruppen. In einer Charakterisierung im Vergleich zu Patienten mit PBC oder einer chronisch viralen Lebererkrankung und gesunden Kontrollen haben Sakaki et al. (2008) ebenfalls die höchsten Werte für Transaminasen und IgG in der Gruppe der AIH-Patienten gemessen. Lüth et al. (2008a) zeigten, dass eine gemeinsame Betrachtung von IgG und Transaminasen bei AIH-Patienten einen verbesserten Rückschluss auf die histologische Entzündungsaktivität zulässt. Aufgrund der Gruppengröße ließ sich diese Beobachtung am hier untersuchten Kollektiv nicht bestätigen. Lediglich zwei AIH-Patienten wiesen Antikörper gegen SLA (Patient AIH-9) bzw. LKM (Patient AIH-12) auf, so dass überwiegend Patienten mit einer AIH Typ 1 untersucht wurden (vgl. Abschnitt 1.5.1 *Die Autoimmune Hepatitis*; (Riemann und Adam 2008)).

In den immunhistochemisch charakterisierten Infiltraten fanden sich, passend zum ausgeprägten Leberschaden, die meisten CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen in den Portalfeldern von Patienten mit AIH. Auch im Leberläppchen fanden sich bei AIH-Patienten im Vergleich zu den anderen Gruppen die stärksten CD8<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> Infiltrate. Portal genauso stark wie das Infiltrat der CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist die Anzahl der CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen bei den Patienten mit einer AIH. Ein schwächeres CD4<sup>+</sup> T-Zell Infiltrat gegenüber den CD8<sup>+</sup> Zellen und den PBC-Patienten wie es Sakaki et al. (2008) berichten konnte bei den AIH-Patienten bei Erstdiagnose nicht nachgewiesen werden. Gegenüber den PSC-Patienten waren die beiden Populationen der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen signifikant erhöht. In den Portalfeldern der AIH-Patienten zeigte sich auch das größte Infiltrat CD20<sup>+</sup> B-Zellen, signifikant höher als bei Patienten mit PSC oder NASH. In Zusammenschau mit den bekannten Antikörpererhöhungen und der deutlichen IgG-Erhöhung, lässt sich vermuten, dass die aktivierten B-Zellen weiter zu Plasmazellen ausreifen. Ein ausgeprägtes Plasmazellinfiltrat ist typisch für die AIH (Oo et al. 2010a). Effektor-T-Zellen und B-Zellen spielen bei der Vermittlung des immunologischen Leberschadens eine zentrale Rolle (Ma et al. 2006; Longhi et al. 2010b). Somit sind die Beobachtungen in dieser Arbeit gut mit den bisher bekannten Pathomechanismen und einem aktiven Stadium der Erkrankung vereinbar.

Bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen sind (peri)portale Ansammlungen von T- und B-Zellen aufgefallen, die von ihrer Struktur und Verteilung an Follikel in primär lymphatischen Organen erinnern. In der Literatur wird diskutiert, dass diese intrahepatischen Strukturen möglicherweise auch funktionell sehr ähnlich zu den Follikeln in Lymphknoten sind. Möglicherweise handelt es sich um Orte der B-Zell Aktivierung, Ausreifung und Vermehrung (Grant et al. 2002a; Racanelli 2006). In dieser Arbeit sind diese Strukturen bei Patienten verschiedener Erkrankungsgruppen vereinzelt beobachtet worden. Ein Zusammenhang, beispielsweise mit dem Krankheitsbild oder der Entzündungsaktivität, konnte nicht hergestellt werden.

Die signifikant höheren Zellzahlen der unspezifischen Immunantwort (CD163- und MPO-Färbung) bei Patienten mit der Erstdiagnose einer AIH lassen vermuten, dass der Leberschaden zu einem Teil ebenfalls durch die Aktivierung des unspezifischen Immunsystems vermittelt wird. Über die Rolle der unspezifischen Immunantwort in AIH-Patienten ist bisher wenig bekannt. CD 163+ Kupffer-Zellen wird eine wichtige Rolle in der Induktion und Aufrechterhaltung hepatischer Toleranz zugesprochen. Möglicherweise interagieren sie ergänzend mit FoxP3+ regulatorischen T-Zellen (Tiegs und Lohse 2009). Eine weitere wichtige Funktion ist die Aktivierung neutrophiler Granulozyten zur Bekämpfung bakterieller Infektionen. MPO+ neutrophile Granulozyten zeigten sich in den Patientengruppen mit höher entzündlicher Aktivität (AIH und PBC) leicht vermehrt, waren jedoch gegenüber den anderen Patientengruppen nicht signifikant zahlreicher. Hinweise auf eine spezifische Rolle in der Pathogenese bei Erstdiagnose autoimmuner Lebererkrankungen finden sich nicht.

### **Regulatorische T-Zellen bei Erstdiagnose einer autoimmunen Hepatitis**

In normalem Lebergewebe finden sich in der Regel nur sehr wenige regulatorische T-Zellen (Xu et al. 2006; Sakaki et al. 2008). Die Funktion, Anzahl und Verteilung von Tregs bei autoimmunen Lebererkrankungen ist Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten. Bisher ist es nicht gelungen, ein einheitliches Bild dieser Zellpopulation zu erlangen. In dieser Untersuchung finden sich bei den AIH-Patienten in den Portalfeldern und im Leberläppchen eine signifikant höhere Anzahl FoxP3+ regulatorischer T-Zellen als bei Patienten aus der NASH- und PSC-Gruppe. Im Median weisen die AIH-Patienten die höchsten Zahlen FoxP3+ Tregs auf. Bei einer gemeinsamen Betrachtung der beiden Patientenkollektive mit stark erhöhter entzündlicher Aktivität (AIH und PBC) findet sich ein positiver Zusammenhang zwischen der Anzahl der FoxP3+ T-Zellen, dem histologischen Aktivitätsindex (mHAI) und der portalen Lymphozyteninfiltration (CD3+, CD4+). Mit steigender Entzündungsaktivität steigt in diesen beiden Patientenkollektiven auch die Anzahl der FoxP3+ T-Zellen in der Leber. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass Patienten mit AIH gegenüber PSC-Patienten sowohl im Portalfeld, als auch im Leberläppchen ein signifikant höheres Verhältnis von FoxP3+ Zellen zu CD3+ Zellen aufweisen. Die Anzahl FoxP3+ Tregs ist hier also nicht nur absolut, sondern auch relativ erhöht.

In den letzten Jahren berichteten verschiedenen Arbeitsgruppen hingegen von einer verminderten Anzahl regulatorischer T-Zellen bei Patienten mit autoimmunen Lebererkrankungen. Ferri et al. (2010) untersuchten die Anzahl regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut von erwachsenen Patienten mit einer AIH Typ 1 im aktiven Stadium und im Stadium der Remission. Die Arbeitsgruppe berichtet, dass die Anzahl CD4+CD25+ Tregs im peripheren Blut von adulten AIH-Patienten im Vergleich zu Gesunden vermindert ist. Bei pädiatrischen Patienten ist dies ebenfalls gezeigt (Longhi et al. 2004). Das numerische Defizit ist in der aktiven Phase am stärksten ausgeprägt, findet sich aber auch in Remissionspatienten. FoxP3 ist in einer gemeinsamen Betrachtung aller AIH-Patienten der Studie signifikant vermindert (Ferri et al. 2010). Im Lebergewebe ihrer Patienten konnten Ferri et al. keine Reduktion feststellen. Im Weiteren berichten sie von einer Einschränkung der suppressiven Funktionalität bei Erwachsenen (Ferri et al. 2010) und pädiatrischen Patienten (Longhi et al. 2006). Die Patienten zeigen Unterschiede zum in dieser Arbeit untersuchten Kollektiv hinsichtlich Alter und Erkrankungsstadium. Eine laufende immunsuppressive Therapie muss für viele der Patienten angenommen werden. In einer vergleichenden Untersuchung von Lan et al. lassen sich bei AIH-Patienten im frühen Stadium signifikant mehr Treg-Zellen im peripheren Blut nachweisen als bei PBC-Patienten in einem ebenfalls frühen Stadium der Erkrankung (Lan et al. 2006). Aktuelle Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten zu einem frühen Zeitpunkt der Erkrankung im peripheren Blut von AIH-Patienten kein numerisches Defizit und kein funktionelles Defizit reproduzieren (Peiseler et al. 2012).

Sakaki et al. (2008) haben den intrahepatischen Status regulatorischer T-Zellen in der Leber bei autoimmunen Erkrankungen und chronischen viralen Entzündungen untersucht. Sie beschreiben eine deutlich erhöhte Anzahl FoxP3+ im Lebergewebe bei Patienten mit einer Lebererkrankung als bei Gesunden. Einen Unterschied zwischen chronischen Virushepatitiden (HBV, HCV) und autoimmunen Lebererkrankungen (AIH, PBC) können sie nicht feststellen. Allerdings beobachteten sie im Lebergewebe von AIH-Patienten weniger Tregs als bei PBC-Patienten (Sakaki et al. 2008).

Eine erhöhte Anzahl regulatorischer T-Zellen in den betroffenen Organen ist mittlerweile auch bei einer Reihe weiterer Autoimmunkrankheiten nachgewiesen (Cao et al. 2006; Marazuela et al. 2006). Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Anzahl FoxP3+ Zellen im betroffenen Lebergewebe ist der quantitative Ausgleich eines funktionellen Defizits. Hinweise auf ein suppressives Defizit, wie bei Longhi et al. (2006) beschrieben, lassen sich bei Patienten mit der Erstdiagnose einer AIH nicht bestätigen (Peiseler et al. 2012). Möglicherweise ist der Entzündungsreiz in den betroffenen Erkrankungen zu stark, um erfolgreich supprimiert zu werden. Bisher unbekannte Pathomechanismen konnten beispielsweise eine effektive Suppression auf der Seite der Effektorzellen verhindern. Pathomechanismus, Rolle und Interaktion der einzelnen beteiligten Zellen bei der AIH bedürfen weiterer Untersuchungen (vgl. Abschnitt 4.5 *Erkenntnisse und künftige Fragestellungen*).

#### 4.2.2 Patienten mit Primär Biliärer Zirrhose

In der Betrachtung der klinisch-chemischen Parameter zeigen die PBC-Patienten (n=13) niedrige Transaminasen-Werte (vgl. Abschnitt 3.1 *Patienten und klinische Parameter*). Im Sinne einer Cholestase finden sich erhöhte Werte der alkalischen Phosphatase. Das bei den PBC häufig (noch) normwertige Gesamt-Bilirubin, die IgM Erhöhung und die AMA Antikörper entsprechen der typischen Laborkonstellation bei Erstdiagnose (Kaplan und Gershwin 2005). Trotz der nur gering erhöhten Transaminasen wurden die PBC-Patienten im pathologischen Grading (mHAI) mit dem im Vergleich zweithöchsten Score bewertet. Dieser ist dennoch signifikant niedriger als bei den AIH-Patienten. In diesen ersten Beobachtungen deutet sich an, was sich in den folgenden histologischen Untersuchungen bestätigt: Die entzündlichen Infiltrate der AIH und PBC-Gruppe unterscheiden sich gleichsinnig von den Infiltraten der PSC und NASH im Sinne einer stärkeren entzündlichen Aktivität.

Bei Erstdiagnose einer PBC finden sich die zweitgrößten Infiltrate an CD3+, CD8+ und CD4+ Lymphozyten im Leberläppchen und CD8+ sowie CD4+ Lymphozyten im Portalfeld. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose portal signifikant mehr CD3+ Zellen bei PBC-Patienten gegenüber den Patienten mit PSC oder NASH. Autoreaktive CD4+ und CD8+ Effektor-T-Zellen sind für die PBC sowohl im peripheren Blut, als auch im Lebergewebe selbst nachgewiesen (Kita et al. 2002; Ichiki et al. 2005). In dieser Untersuchung zeigt sich ein annähernd gleich großes Infiltrat CD4+ und CD8+ T-Zellen im Portalfeld. In der vergleichenden Untersuchung von Sakaki et al. (2008) zeigen sich im Portalfeld von AIH- und PBC-Patienten ebenfalls keine Unterschiede bei der Darstellung CD8+ T-Zellen. Bei der Untersuchung CD4+ T-Zellen berichtet die Arbeitsgruppe von einer signifikant höheren Zellzahl der PBC-Patienten im Vergleich zu AIH-Patienten (Sakaki et al. 2008). Sakaki et al. (2008) geben keine Auskunft über das Stadium der Erkrankung ihrer Patienten und eine mögliche medikamentöse Therapie. Möglicherweise liegt hier die Ursache für die größere CD4+ Population der PBC-Patienten in ihrer Arbeit. In gemeinsamer Betrachtung zu den lobulären Werten fällt auf, dass im Falle der PBC die Zunahme des portalen lymphozytären Infiltrats im Verhältnis zum lobulären Infiltrat stärker ausgeprägt sein kann, als beispielsweise bei der AIH. Ein mildes lobuläres Infiltrat ist typisch für die Histologie bei PBC (Poupon et al. 1999). In dieser Arbeit erfolgte die Auswahl repräsentativer Areale im portalen und im lobulären Lebergewebe. Nicht erfasst wurde das Entzündungsinfiltrat in der periportalen Zone. Bei der PBC wird gelegentlich eine ausgeprägte periportale Aktivität beschrieben (Scheuer 1967). Möglicherweise führt diese Betrachtung zu einer Unterschätzung des Entzündungsinfiltrats bei den PBC-Patienten.

In den Portalfeldern der PBC-Patienten findet sich ebenfalls die zweitgrößte Zellpopulation CD20+ B-Zellen in den vier untersuchten Patientengruppen. Im Vergleich zu den anderen ist dieser Unterschied jedoch nicht signifikant. Das pathognomonische Vorkommen von AMA Antikörpern und die starke IgM Erhöhung lassen, ähnlich wie bei der AIH, ein Ausreifen der CD20+ B-

Zellen zu Plasmazellen vermuten. Auch die Zellen des unspezifischen Immunsystems sind bei Patienten mit PBC im Vergleich zu den NASH- oder PSC-Patienten häufiger. Bei den CD163+ Kupffer-Zellen findet sich portal ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den PSC-Patienten und lobulär signifikant höhere Zellzahlen als bei Patienten mit der Erstdiagnose einer NASH. Wie bereits berichtet zeigten sich MPO+ neutrophile Granulozyten in den Patientengruppen mit höher entzündlicher Aktivität (AIH und PBC) leicht vermehrt (ns) ohne Hinweis auf eine pathogenetisch bedeutsame Rolle.

### **Regulatorische T-Zellen bei Erstdiagnose einer Primär Biliären Zirrhose**

Bei der Betrachtung der FoxP3+, regulatorischen T-Zellen weisen die PBC-Patienten lobulär eine mäßige und im Portalfeld eine starke Erhöhung der Zellzahl auf. Im Vergleich zu den PSC Patienten ist diese im Portalfeld signifikant. Die Zellzahlen bleiben jedoch unter denen der AIH-Patienten. Im Leberläppchen sind es signifikant weniger als bei den AIH-Patienten.

Von einer signifikant vermehrten Anzahl Foxp3+ Tregs im Lebergewebe von PBC-Patienten im Vergleich zu PSC berichten auch Koyabu et al. (2010) in einer vergleichenden Arbeit. Und auch Sakaki et al. (2008) berichten neben dem Unterschied zu AIH-Patienten, von einer signifikant erhöhten Treg-Anzahl in der Leber bei PBC-Patienten gegenüber gesunden Kontrollen. Diese Erkenntnisse lassen aufmerken, denn ähnlich wie bei der AIH existiert auch bei der PBC die Hypothese des funktionellen und möglicherweise auch numerischen Defizits regulatorischer T-Zellen als Ursache für den autoreaktiven, zytotoxischen Leberschaden. Lan et al. (2006) beschreiben bei PBC-Patienten ein numerisches Defizit von Tregs im peripheren Blut. In der Immunhistochemie zeigt die Gruppe in den Portalfeldern von PBC-Patienten im frühen und im fortgeschrittenen Stadium eine verminderte Anzahl FoxP3+ Tregs im Vergleich zu Patienten mit einer chronischen Hepatitis C Infektion und im frühen Stadium auch im Vergleich zu AIH-Patienten. Gesunde Kontrollen wurden nicht untersucht. *In vitro* unterscheidet sich die suppressive Kapazität FoxP3+ Tregs gesunder Probanden nicht von PBC-Patienten (Lan et al. 2006). Die Arbeitsgruppe um M. Sasaki (2007) hat mittels Immunhistochemie die hepatische Verteilung von FoxP3+ T-Zellen bei gesunden Probanden und bei Patienten mit PBC oder einer chronischen viralen Hepatitis in verschiedenen Aktivitätsstadien untersucht. Zusätzlich analysierten sie mRNA Level von FoxP3 und diversen Zytokinen im Lebergewebe. In den Portalfeldern von PBC-Patienten mit starker Entzündungsaktivität sind signifikant mehr FoxP3+ Zellen gefunden worden als in den Portalfeldern von PBC-Patienten mit niedriger Entzündungsaktivität. Die mRNA von FoxP3, IL-10 und TGF- $\beta$  ist in PBC-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht. Interferon- $\gamma$ - und TNF- $\alpha$ -mRNA ist bei PBC-Patienten im Frühstadium und bei den chronischen Virushepatitiden erhöht (Sasaki et al. 2007). Wang et al. (2010) berichten bei PBC-Patienten von einer Reduktion der CD4+CD25+ Tregs im peripheren Blut. In der Leber zeigen sie eine erhöhte Anzahl FoxP3+ Tregs und, ähnlich wie bei den Beobachtungen von Sasaki et al., eine erhöhte Expression regulatorischer Zytokine wie TGF- $\beta$  und IFN- $\gamma$ . Wie auch diese Arbeit zeigen die genannten Untersuchungen eine erhöhte An-

zahl FoxP3+ Zellen im Leberparenchym von Patienten mit einer PBC. Die Erhöhung ist abhängig vom Krankheitsstadium. Diese Arbeit zeigt zudem, dass die Anzahl Foxp3+ Tregs bei AIH- und PBC-Patienten möglicherweise mit dem Grad der Entzündung (mHAI) und der Größe des entzündlichen Infiltrats in Verbindung steht (vgl. Abschnitt 3.5 *Korrelative Betrachtungen*).

Viele beobachtete Veränderungen im entzündlichen Infiltrat verhielten sich bei den Patienten mit PBC ähnlich zu den an einer AIH erkrankten Patienten. Analog zur niedrigeren Bewertung im mHAI-Score waren die Veränderungen häufig geringer ausgeprägt als bei den AIH-Patienten und im Vergleich zu den weniger entzündlich aktiven Erkrankungen (PSC und NASH) auch seltener signifikant. Dennoch lassen die Ergebnisse dieser Arbeit auch bei der PBC an der Hypothese des numerischen Defizits zweifeln. Da bisher Hinweise auf ein funktionelles Defizit fehlen (Lan et al. 2006; Sasaki et al. 2007), muss die Ursache für die ineffektive Suppression trotz einer erhöhten Anzahl FoxP3+ Zellen im betroffenen Lebergewebe weiter gesucht werden. Ähnlich wie bei der AIH ist ein Defekt der autoreaktiven Effektor-Zellen oder die Existenz eines bisher unbekanntem starken antisuppressiven Reizes vorstellbar. Die für erhöhte Anzahl FoxP3+ Tregs in AIH und PBC-Patienten aufgeführten Argumente werden abschließend im Abschnitt 4.5 *Erkenntnisse und künftige Fragestellungen* zusammengefasst.

### 4.2.3 Patienten mit Primär Sklerosierender Cholangitis

Die Patienten mit einer PSC (n=7) weisen unter den vier Patientengruppen die zweithöchsten Transaminasenwerte auf und erreichen im Sinne einer cholestatischen Hepatopathie die höchsten Werte für die alkalische Phosphatase und das Bilirubin. Die Unterschiede in der klinischen Chemie sind im Vergleich zu den anderen Gruppen nicht signifikant, jedoch typisch für das Krankheitsbild im frühen Stadium (Tischendorf et al. 2008). In der Antikörperbestimmung lässt sich kein spezifisches Muster erkennen. Passend zu den weiteren Beobachtungen im entzündlichen Infiltrat ist bei den PSC-Patienten ein niedriger mHAI-Score bestimmt worden (statistisch signifikant gegenüber den AIH-Patienten).

Bei der Betrachtung des Entzündungsinfiltrats finden sich niedrige Zellzahlen, die sich in der Regel nicht signifikant von den ebenfalls niedrigen Zahlen der NASH-Patienten unterscheiden. Gegenüber den beiden anderen Patientengruppen mit hoher entzündlicher Aktivität (PBC und AIH) sind die Zellzahlen in vielen Fällen signifikant niedriger. Beispielsweise ist bei den PSC-Patienten die portale Anzahl von CD3+ Zellen gegenüber den PBC-Patienten oder die portale Anzahl von CD8+ und der CD4+ Zellen im Vergleich zu Patienten mit der Erstdiagnose einer AIH signifikant vermindert. Das vornehmlich T-Zell-dominierte lymphozytäre Infiltrat ist auch in der Literatur nicht eindeutig charakterisiert. Es finden sich Belege für ein Überwiegen der CD4+ T-Zellen, der CD8+ T-Zellen oder einem Gleichgewicht der beiden Zellpopulationen (Aron und Bowlus 2009). In dieser Untersuchung zeigt sich ein leichtes Überwiegen der CD8+ T-Zellen (portal 1,6:1). Betrachtet man das B-Zell Infiltrat gemeinsam mit den Ergebnisse der untersuchten T-

Zellpopulationen so wird deutlich, dass die Zellen der spezifischen Immunabwehr bei der PSC quantitativ eine geringere Rolle spielen, als bei den autoimmunen Hepatopathien PBC und AIH.

Die portale Anzahl CD20+ Zellen ist gegenüber Patienten mit einer AIH signifikant erniedrigt. Während in den anderen Patientengruppen das Infiltrat an CD20+ Zellen im portalen Lebergewebe bis zu 124-fach höhere Zellzahlen als im lobulären Lebergewebe aufweist, zeigen die Patienten der PSC-Gruppe portal auffällig niedrige Zellzahlen (2,5:1). Die spezifische Rolle von B-Zellen bzw. ausgereiften Plasmazellen in der PSC ist noch nicht vollständig bekannt. Im Gegensatz zur Steroid-sensiblen IgG4-sklerosierenden Cholangitis stellen sie kein besonderes Erkrankungsmerkmal dar und treten nur in geringer Zahl auf (Nakanuma und Zen 2007).

Das im Verhältnis zu den PBC- und AIH-Patienten schwächere lymphozytäre Infiltrat wird bei den Patienten mit der Erstdiagnose einer PSC nicht durch ein stärkeres Infiltrat der unspezifischen Abwehr kompensiert. Die portale Anzahl CD163+ Zellen ist bei den PSC-Patienten signifikant geringer als bei Patienten mit einer PBC oder AIH. Cameron et al. untersuchten die Verteilung von Kupffer-Zellen bei PSC-Patienten mittels einer immunhistochemischen Färbung auf CD68 und elektronenmikroskopischen Untersuchungen. In der bei ihnen signifikant erhöhten Anzahl sinusoidaler und perisinusoidaler Kupffer-Zellen im Vergleich zu PBC-Patienten sehen sie eine mögliche Ursache in der Vermittlung von Fibrose und Zirrhose (Cameron et al. 2001). Ursächlich für die abweichenden Ergebnisse dieser Untersuchung sind die möglichen unterschiedlichen Erkrankungsstadien sowie die potentielle Medikation der Patienten.

### **Regulatorische T-Zellen bei Erstdiagnose einer Primär Sklerosierenden Cholangitis**

Bei der Untersuchung der FoxP3+ regulatorischen T-Zellen von Patienten mit der Erstdiagnose einer PSC zeigt sich auch hier ein schwaches Infiltrat. Im Median weisen die PSC-Patienten bei Erstdiagnose sowohl portal als auch lobulär die geringste Anzahl FoxP3+ Zellen auf. Im Portalfeld ist dieser Unterschied gegenüber den Patienten mit PBC und AIH, im Leberläppchen gegenüber den AIH-Patienten signifikant. Gegenüber den Patienten mit der Erstdiagnose einer AIH zeigt sich auch das Verhältnis FoxP3+ Zellen zu CD3+ T-Zellen signifikant erniedrigt.

Zu Status und Funktion regulatorischer T-Zellen in der PSC ist in der Literatur weniger bekannt als bei der AIH und PBC. In einer Arbeit zur autoimmunen Pankreatitis und der IgG4-sclerosierenden Cholangitis haben Koyabu et al. (2010) Leberbiopsien von Patienten mit AIH, PBC und PSC untersucht. Die Autoren beschreiben einen signifikant verminderten Anteil FoxP3+ Zellen an der Gesamtheit der Monozyten bei Patienten mit PSC im Vergleich zu AIH- und PBC-Patienten. Die Patienten befanden sich häufig bereits in sehr weit fortgeschrittenen Krankheitsstadien. Teilweise erfolgte die Probenentnahme zum Zeitpunkt der Lebertransplantation, was die Vergleichbarkeit mit den hier zum Zeitpunkt der Erstdiagnose untersuchten Patienten einschränkt. Unveröffentlichte, aktuelle Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten im peripheren Blut bei PSC-Patienten eine verminderte Anzahl CD4+ CD25<sup>high</sup> CD127<sub>low</sub> Foxp3+ Tregs gegenüber PBC-Patienten und ge-

sunden Kontrollen nachweisen. Zusätzlich zeigte sich auch ein funktionelles Defizit in der suppressiven Kapazität regulatorischer T-Zellen von PSC-Patienten (*unveröffentlichte Daten*). Der Beitrag des potentiell numerischen und funktionellen Defizits zur Pathogenese der PSC wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Die Resultate dieser Arbeit unterstützen die Hypothese des numerischen Defizits. Es lässt sich, in Hinblick auf den niedrigen mHAI-Score, jedoch nicht ausschließen, dass mit Krankheitsprogression und zunehmender entzündlicher Aktivität die Anzahl FoxP3+ regulatorischer T-Zellen bei diesen Patienten weiter ansteigt.

#### 4.2.4 Patienten mit nicht alkoholischer Steatohepatitis

Die Patienten mit einer NASH (n=8), einem nicht-autoimmunen Leberschaden, dienen in dieser Arbeit als Vergleichsgruppe zu den untersuchten autoimmunen Hepatopathien. Sie weisen bei Erstdiagnose ebenfalls eine entzündliche Aktivität auf (mHAI 2,75) und zeigen durch erhöhte Transaminasen auch laborchemisch Hinweise auf den typischen Leberparenchymschaden (Riemann und Adam 2008). Mit einer Ausnahme sind alle Patienten Antikörper negativ. Das Vorkommen unspezifischer Antikörper ist für bis zu einem Drittel der NASH-Patienten beschrieben (Cotler et al. 2004). Sowohl portal als auch lobulär weisen die NASH-Patienten, in den meisten Fällen gemeinsam mit den PSC-Patienten, die geringsten Zellzahlen auf. Dies gilt sowohl für die Zellen der spezifischen Immunantwort, insbesondere für die regulatorischen FoxP3+ T-Zellen, als auch für die Zellen des unspezifischen Immunsystems. Bei der Darstellung CD163+ zeigt sich im Leberläppchen sogar ein signifikanter Unterschied gegenüber den Patienten mit einer PSC. Ein schwaches lobuläres Entzündungsinfiltrat aus CD3+ Lymphozyten und eosinophilen und neutrophilen Granulozyten ist typisch für die NASH (Hübscher 2006). Ein stark ausgeprägtes portales Infiltrat ist untypisch für die Vorstufe der Fettlebererkrankung und gilt als sicheres Zeichen für die Ausbildung einer Fettleberhepatitis (NASH) (Brunt und Tiniakos 2010). In einer volumen-korrigierten Analyse von CD68+ Makrophagen berichten Söderberg et al. (2011) von einer erhöhten Anzahl lobulärer Kupffer-Zellen in fortgeschrittenen Entzündungsstadien bei NASH-Patienten. Eine Erklärung ist das mögliche Unterschätzen der Zellzahl im lobulären Lebergewebe der NASH-Patienten in dieser Untersuchung (vgl. Abschnitt 4.1.4 *Die NASH-Patienten*)

#### Regulatorische T-Zellen bei Erstdiagnose einer nicht alkoholischen Steatohepatitis

In einer der wenigen Untersuchungen zum lymphozytären Infiltrat bei NASH-Patienten zeigen Söderberg et al. (2011) eine gleichmäßige Verteilung von FoxP3+ T-Zellen in Leberläppchen und Portalfeld. Sie berichten von einem Anstieg des Foxp3+/CD3+ Anteils bei steigender Entzündungsaktivität. Die entzündliche Aktivität bei den NASH-Patienten dieser Arbeit ist mit einem mHAI-Score zwischen 2 und 4 (Mittelwert 2,75) bewertet. Im Vergleich zu den AIH-Patienten mit starker Entzündungsaktivität (mHAI 7,83) sind die FoxP3+ Tregs signifikant vermindert. Ein Vergleich mit einer weiteren Kontrollpopulation ohne Entzündungsaktivität ist nicht vorgenommen worden. Die FoxP3+ T-Zellen verhielten sich sowohl absolut, als auch relativ im Verhältnis zu den

CD3+ bzw. CD4+ T-Zellen ähnlich den Tregs der PSC-Patienten. Ob die geringe Anzahl FoxP3+ T-Zellen zur Pathogenese der NASH beiträgt, müssen kommende Untersuchungen zeigen.

### 4.3 Bewertung der histologischen Entzündungsaktivität

Die Entwicklung der Immunpopulationen in den verschiedenen Krankheits- und Aktivitätsstadien ist bei den autoimmunen Hepatopathien noch nicht ausreichend genau charakterisiert. Ein Einfluss des Krankheitsstadiums auf die einzelnen Zellpopulationen lässt sich nicht ausschließen. Im Gegensatz zu einigen aktuellen Veröffentlichungen wurden die Patienten dieser Arbeit zu einem einheitlichen Zeitpunkt (Erstdiagnose) untersucht. Die entzündliche Aktivität der untersuchten Gewebeproben ist eindeutig dokumentiert (mHAI) und ein frühes Krankheitsstadium ist anzunehmen. Interindividuelle Unterschiede in der histologischen und laborchemischen Entzündungsaktivität zeigen Tabelle 21 und Tabelle 22 im Anhang dieser Arbeit. Eine weitere Homogenisierung erwies sich aufgrund der Gruppengröße als nicht praktikabel. In Hinblick auf die FoxP3+ Tregs finden sich in der Literatur Hinweise darauf, dass das Erkrankungsstadium Einfluss auf die Treg Population nimmt. In einer Veröffentlichung untersuchte die Arbeitsgruppe Sakaki et al. (2008) Tregs bei Patienten mit AIH, PBC und chronischen Virushepatitiden in verschiedenen Krankheitsstadien. Sie berichten von einer Abnahme von Tregs mit zunehmendem Fortschritt der PBC-Erkrankung. Die gleiche Beobachtung im Lebergewebe machten auch Lan et al. (2006), wobei sie im peripheren Blut weniger FoxP3+ Tregs im frühen, als im späten Stadium fanden. Sasaki et al. (2007) beschreiben eine erhöhte Anzahl Foxp3+ Zellen in den Portalfeldern von PBC-Patienten mit hoher Krankheitsaktivität. Möglicherweise zeichnen sich insbesondere die AIH und PBC bei Erstdiagnose durch eine starke Krankheitsaktivität aus, welche mit hohen Treg-Zahlen einhergeht. Das Treg Infiltrat könnte mit Krankheitsprogression in Phasen geringerer Aktivität oder Remission abnehmen. Die Daten von Lan et al. (2006) und Longhi et al. (2004), welche von einer Reduktion im peripheren Blut berichten, stammen beispielsweise nicht von Patienten im frühen Krankheitsstadium.

Sakaki et al. (2008) können keine Korrelation zwischen histologischer oder biochemischer Krankheitsaktivität und den Entzündungsinfiltraten nachweisen. In dieser Arbeit ist ein möglicher Zusammenhang zwischen der Anzahl von FoxP3+ Tregs und dem histologischen Aktivitätsindex bzw. der portalen Lymphozyteninfiltration (CD3+, CD4+) gezeigt worden (vgl. Abschnitt 3.5 *Korrelative Betrachtungen*).

### 4.4 Bewertung der klinischen und laborchemischen Charakterisierung der Patientenkollektive

Wie bereits im vorigen Abschnitt gezeigt, scheinen Erkrankungsstadium und Entzündungsaktivität die Anzahl FoxP3+ Tregs im Lebergewebe zu beeinflussen. Klinische und laborchemische Eigenschaften der Patienten kommen als weitere Einflussgrößen in Frage (vgl. Anhang Tabelle 20 und

21). Ein diskutierter Faktor ist das Alter der Patienten. Die Anzahl naiver Tregs scheint mit dem Alter stark abzunehmen (4-10% der CD4+ T-Zellen im Nabelschnurblut vs 0,5-1,5% in erwachsenen Probanden) (Sakaguchi et al. 2010). Dahingegen steigt die Anzahl von ausgereiften Effektor-Tregs bei Erwachsenen und älteren Menschen an (0-0,5 % im Nabelschnurblut vs 4% bei älteren Erwachsenen) (Miyara et al. 2009a; Sakaguchi et al. 2010). Eine erhöhte Anzahl von regulatorischen T-Zellen könnte also auch Ausdruck eines ausgereiften Immunsystems sein. Ein signifikanter Altersunterschied findet sich bei den in dieser Arbeit untersuchten Gruppen nur zwischen den PBC und PSC-Patienten, eine Korrelation zwischen der Anzahl an FoxP3+ Zellen und dem Alter ließ sich in der statistischen Analyse nicht nachweisen. Hinweise auf geschlechtsspezifische Unterschiede sind ebenfalls bekannt (Lapierre et al. 2010). Im Menschen ist es aufgrund der bekannten Prädispositionen zur jeweiligen Erkrankung (vgl. Abschnitt 1.5 *Leber- und Gallenwegserkrankungen*) schwierig eine ausreichende Gruppengröße mit beiden Geschlechtern zu erreichen.

Bei der Interpretation von Untersuchungen an Treg-Populationen muss ebenfalls der mögliche Einfluss von Medikationen auf die Anzahl dieser Zellen bedacht werden. Während die funktionelle Kapazität sich durch den Einsatz von Kortikosteroiden möglicherweise verbessern lässt (Nouri-Aria et al. 1982; Luther et al. 2009), ist im peripheren Blut eine Abnahme regulatorischer T-Zellen unter immunsuppressiver Therapie beschrieben (Demirkiran et al. 2005). Da die Patienten zum Zeitpunkt Erstdiagnose der jeweiligen Erkrankung untersucht wurden, ist davon auszugehen, dass die Einnahme immunsuppressiver Medikamente selten ist. Die Dokumentation der Vormedikation in den Patientenunterlagen ist regelhaft unvollständig. Die im Anhang aufgeführte Medikation bezieht sich auf die im Entlassungsbrief zum Diagnosezeitpunkt dokumentierten Medikamente. In der Regel ist davon auszugehen, dass diese erst nach der diagnostischen Punktion verordnet worden sind. Die probatorische Therapie mit Kortikosteroiden vor definitiver Diagnosesicherung in wenigen Fällen ist denkbar.

## 4.5 Erkenntnisse und künftige Fragestellungen

Trotz der im Abschnitt 1.4.3 *Tregs in therapeutischen Ansätzen* beschriebenen viel versprechenden Ergebnisse therapeutischer Ansätze, zeigen die im vorangehenden Abschnitt erläuterten Arbeiten und die eigenen Ergebnisse, dass die grundlegende Rolle und Funktion FoxP3+ regulatorischer T-Zellen bei autoimmunen Hepatopathien noch nicht vollständig verstanden ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden einen Beitrag zu der noch abzuschließenden Diskussion über ihre Anzahl und Verteilung. Ein enger Zusammenhang mit der funktionellen Kapazität ist zu vermuten und sollte bei künftigen Diskussionen stets mit betrachtet werden (vgl. teilweise *unveröffentlichte Daten* der eigenen Arbeitsgruppe und (Peiseler et al. 2012)). Die verschiedenen hier aufgeführten Arbeiten zeigen, dass von der Anzahl regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut nicht direkt auf die Größe der Zellpopulation in betroffenen Organen geschlossen werden kann. Möglicherweise stehen beide Populationen sogar in einem gegensätzlichen Verhältnis. Trotz der Unterschiede zwischen Erhe-

bungen des Treg-Status im betroffenen Gewebe und im peripheren Blut wurde bisher in wenigen Arbeiten Proben der gleichen Individuen zum gleichen Zeitpunkt aus beiden Lokalisationen untersucht. Auch der Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe kann weitere aufschlussreiche Daten liefern. Da die Leberbiopsie einen deutlich invasiveren Eingriff mit höherem Komplikationsrisiko darstellt als beispielsweise die Blutentnahme, ist das Erstellen einer Gewebebank aus gesunden Kontrollen in der Regel sehr aufwendig. Wie bereits im Abschnitt 4.1 *Bewertung der Immunhistochemie* erläutert, sind bei der zukünftigen Bewertung immunhistochemischer Untersuchungen vergleichbare Auswertungsstandards wünschenswert. Eine Erhebung, ähnlichen dem Aufbau in dieser Arbeit, an einem größeren Patientenkollektiv würde eine weitergehende Homogenisierung der Patienten nicht nur anhand des histologischen Entzündungsstadiums, sondern auch in Hinblick auf die laborchemischen Parameter und das klinische Erkrankungsstadium ermöglichen. Möglicherweise sind an einem sehr großen Kollektiv auch Analysen in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht möglich. Prospektiv wäre es unter Umständen leichter, mögliche Einflussgrößen wie beispielsweise die Medikation zu identifizieren und zu berücksichtigen. Ein prospektiver Ansatz würde an einem einzigen Standort jedoch aufgrund der Epidemiologie der Erkrankungen einen sehr langen Zeitraum benötigen.

In Hinblick auf die bestehende Diskussion über FoxP3<sup>+</sup> als spezifischen Marker des Treg-Phänotyps (vgl. Abschnitt 4.1.1 *Der Treg-Phänotyp und FoxP3*) sind weitere Untersuchungen des Phänotyps regulatorischer T-Zellen bzw. FoxP3<sup>+</sup> Zellen in der Leber nötig. Die aktuellen Ergebnisse lassen vermuten, dass FoxP3<sup>+</sup> im Menschen und auch in der Leber den zurzeit besten singulären Marker für regulatorische T-Zellen darstellt. In Hinblick auf die Immunhistochemie wäre es interessant, beispielsweise mittels Mehrfachfärbungen herauszufinden, inwieweit Zellen mit schwacher FoxP3 Expression wie beispielsweise FoxP3<sub>low</sub> CD45RA<sup>+</sup> CD45RO<sup>-</sup> CD127<sub>low</sub> CD25<sup>high</sup> Zellen in der Färbung auf FoxP3<sup>+</sup> abgebildet werden (vgl. Miyara et al. (2009b) und Abschnitt 4.1.1 *Der Treg-Phänotyp und FoxP3*). Möglicherweise gelingt es zukünftig durch weitere Charakterisierung und etablierte Mehrfachfärbungen immunhistochemisch nTregs und iTregs getrennt darzustellen. Welche der vielen Mechanismen regulatorischer T-Zellen (vgl. Abschnitt 1.4.2 *Tregs: Mechanismen*) *in vivo* und in den verschiedenen Erkrankungen eine Rolle spielen, ist nicht Gegenstand dieser Untersuchung. Dennoch sollten zukünftige funktionelle Analysen klären, welche der häufig bisher nur *in vitro* gezeigten Mechanismen *in vivo* eine Rolle spielen und ob die verwendeten Mechanismen je nach Situation variieren.

Betrachtet man die Ergebnisse der Quantifizierung FoxP3<sup>+</sup> Tregs in dieser Arbeit gemeinsam mit den im jeweiligen Abschnitt erläuterten aktuellen Veröffentlichungen, so erscheint ein numerisches Defizit im Falle der PSC-Patienten denkbar. Das Entzündungsinfiltrat dieser Patienten zeigte sich auf ähnlich niedrigem Niveau wie das in den niedrig entzündlichen und nicht immunologisch bedingten Veränderungen der NASH-Patienten. Hier lassen sich durch Untersuchungen in stärker entzündlichen Phasen der Erkrankung und zusätzliche funktionelle Analysen der Tregs weitere Erkenntnisse gewinnen. Für die AIH und PBC bleibt zu klären, welche Mechanismen in der Leber

dazu führen, dass trotz einer hohen Zahl vermutlich funktionell potenter, regulatorischer T-Zellen die autoimmune Inflammation nicht unterdrückt werden kann. Das auftreten größerer Infiltrate regulatorischer T-Zellen könnte direkt verbunden sein mit einem immunologisch vermittelten Gewebeschaden. In einem Mausmodell der AIH haben Zierden et al. (2009) mittels Transfer autoreaktiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen einen inflammatorischen Leberschaden erzeugt. Neben den starken CD8<sup>+</sup> Infiltraten beschreiben sie in der Leber der Tiere auch eine stark erhöhte Anzahl CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T Zellen. Weiterhin ist denkbar, dass die Zunahme an FoxP3<sup>+</sup> Zellen den quantitativen Ausgleich eines funktionellen Defizits darstellt. Aktuelle Untersuchungen zeigen weder ein numerisches, noch ein funktionelles Defizit bei AIH-Patienten (Lan et al. 2006; Oo et al. 2010b; Peiseler et al. 2012). Andere Arbeitsgruppen haben sogar erhöhte regulatorische Aktivität in Patienten mit autoimmunen Lebererkrankungen nachgewiesen (Sasaki et al. 2007; Wang et al. 2010). Eine Erklärung für eine ausreichende suppressive Kapazität regulatorischer T-Zellen *in vitro* und eine insuffiziente Immunsuppression und damit verbundene immunologisch vermittelte Organschäden *in vivo* könnte sein, dass funktionstüchtige Tregs durch bisher unbekannte Faktoren vor Ort an einer effektiven Suppression gehindert werden (Oo et al. 2010b). Bei dendritischen Leberzellen ist beispielsweise ein inhibitorischer Einfluss auf regulatorische T-Zellen beschrieben (Wiegard et al. 2005). Möglicherweise führen pathogenetische Vorgänge aber auch dazu, dass die Effektor-Zellen gegen eine effektive Suppression resistent sind (Buckner 2010). Scholz et al. (1998) berichten, dass autoreaktive T-Zellen in Autoimmunkrankheiten eine deutlich verminderte Schwelle zur Aktivierung besitzen und so möglicherweise schwerer zu supprimieren sind. Baecher-Allan et al. (2001; 2002) beschreiben *in vitro*, dass eine starke Stimulation und Aktivierung der Effektorzellen eine Suppression durch regulatorische T-Zellen verhindert. Longhi et al. (2006) beschreiben eine verminderte Apoptoserate bei CD4<sup>+</sup> Effektorzellen in Patienten mit einer AIH.

Die aktuell widersprüchlichen Ergebnisse hinsichtlich der verschiedenen Treg-Subpopulationen und ihrer Funktion lassen vermuten, dass es nach der unterschiedlichen Aktivierung offensichtlich nicht zwingend eine gemeinsame Endstrecke der nTregs und iTregs gibt, sondern dass auch unterschiedliche Funktionen denkbar sind. Um diese und ähnliche Beobachtungen richtig einzuordnen muss jedoch zunächst gezeigt werden, welche Anzahl und funktionelle Aktivität induzierte FoxP3<sup>+</sup> im Menschen aufweisen. Auch funktionelle Unterschiede muriner und menschlicher FoxP3<sup>+</sup> Zellen werden diskutiert (Koyabu et al. 2010). Zum anderen ist es möglich, dass Tregs mit voller funktioneller Potenz sich in verschiedenen Aktivitätszuständen befinden (Miyara et al. 2009b). Insbesondere bei den autoimmunen Hepatopathien sollte zukünftig ebenfalls die Bedeutung weiterer potentiell regulatorischer Zellpopulationen im Zusammenhang untersucht werden. Der kürzlich beschriebenen T-Zell Subpopulation der Th17-Zellen werden zwar primär proinflammatorische Eigenschaften zugesprochen, dennoch vermuten einige Autoren zusätzlich eine regulatorische Funktion. Zenewicz et al. (2007) beschreiben dies in der Leber. Besonders interessant ist ihre scheinbar reziproke Beziehung zu den beschriebenen iTregs (Bettelli et al. 2006). Zhou et al. (2008) berichten von einer transienten FoxP3 Expression in 25% der CD4<sup>+</sup> Th17-Zellen im Darm und

vermuten sogar einen gemeinsamen Ursprung von FoxP3+ Tregs und Th17-Zellen. Umfangreichere Erkenntnisse werden auch bei den nach ihrem abweichendem T-Zell-Rezeptor ( $\gamma\delta$ - statt  $\alpha\beta$ - Ketten) benannten  $\gamma\delta$ -T-Zellen benötigt. Sie machen im peripheren Blut etwa 5% der T-Zellen aus, in der Leber jedoch finden sich deutlich größere  $\gamma\delta$ -T-Zellpopulationen von 15%-25% aller hepatischen T-Zellen (Racanelli 2006). Ferri et al. (2010) berichten von Unterschieden bei Patienten mit AIH und gesunden Kontrollen.

Die hier genannten Aspekte zeigen, dass das grundlegende Verständnis von Bedeutung und Funktionsweise regulatorischer T-Zellen in autoimmunen Hepatopathien weiterer Klärung bedarf. Die hierzu vorgeschlagenen künftigen Fragestellungen sollten nicht aufgrund aussichtsreicher Transferexperimente vernachlässigt werden. Möglicherweise werden weitere Grundlagenerkenntnisse hinsichtlich Ausreifung, Funktion und Lokalisation regulatorischer T-Zellen *in vivo* notwendig sein, ehe man in der Lage ist, diese Zellpopulation therapeutisch zu nutzen. Durch die Aufdeckung ihrer pathogenetischen Bedeutung in den verschiedenen Lebererkrankungen könnten sich neue Forschungsansätze ergeben.

## 5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war eine klinische und laborchemische Charakterisierung von Patienten, bei denen die Erstdiagnose einer AIH, PBC, PSC oder NASH Erkrankung gestellt worden ist. In histologischen Untersuchungen wurde die Entzündungsaktivität (mHAI) bei Erstdiagnose bestimmt. Im experimentellen, praktischen Teil wurden verschiedene immunhistochemische Färbungen angefertigt um im Lebergewebe der Patienten die Zusammensetzung des Immunzellinfiltrats bei Erstdiagnose zu charakterisieren. Vor dem Hintergrund aktueller Fragestellungen lag ein besonderer Fokus auf der Rolle regulatorischer FoxP3+ T-Zellen. Eine gemeinsame Betrachtung mit den zusätzlich erhobenen Parametern erlaubte nicht nur Aussagen über Anzahl und Verteilung von Tregs in den verschiedenen Hepatopathien, sondern auch die Bewertung in Hinblick auf die histologische entzündliche Aktivität und das Verhältnis zu übergeordneten Zellpopulationen.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen hat ergeben, dass sich der überwiegende Teil des Entzündungsinfiltrats erwartungsgemäß in den Portalfeldern befindet. Hier übersteigen die Zellzahlen/mm<sup>2</sup> jene im Leberläppchen teilweise um das 10- bis 25-fache. Die Zellpopulationen im Leberläppchen verändern sich in der Regel gleichsinnig zu jenen im Portalfeld. Lediglich bei den CD20+, CD163+ und MPO+ Zellpopulationen sind unterschiedliche Tendenzen in den verschiedenen Lokalisationen zu beobachten (vgl. Abschnitte *3.4.2 B-Zellen* und *3.4.3 Zellen der unspezifischen Immunantwort*). Die Population der CD4+ T-Helfer Zellen ist deutlich größer als beispielsweise bei Untersuchungen im peripheren Blut. Mit Ausnahme der PSC-Patienten finden sich annähernd gleich große Zellpopulationen von CD4+ und CD8+ Zellen.

In Hinblick auf regulatorische T-Zellen zeigen die Resultate dieser Arbeit im Portalfeld und im Leberläppchen eine hohe Anzahl FoxP3+ bei Patienten mit einer AIH. Für Patienten mit PBC konnte eine Erhöhung gegenüber PSC-Patienten im Portalfeld gezeigt werden (vgl. Abschnitt *3.4.1 T-Zell Populationen*). Die AIH und PBC Patienten zeigen die höchsten Werte in der histologischen Entzündungsaktivität (mHAI) (vgl. Abschnitt *3.2 Der modifizierte histologische Aktivitätsindex (mHLAI)*). Bei einer gemeinsamen Untersuchung dieser beiden Patientengruppen zeigt sich für die Anzahl der FoxP3+ im Portalfeld ein Zusammenhang mit dem mHAI-Score bzw. des portalen Infiltrats CD3+ und CD4+ T-Zellen (vgl. Abschnitt *3.5 Korrelative Betrachtungen*). Bei den Patienten mit einer AIH fand sich ein signifikant höheres Verhältnis von Foxp3+ Zellen zu CD3+ Zellen. Die Hypothese des numerischen Defizits lässt sich für Patienten mit einer AIH und wahrscheinlich auch für Patienten mit einer PBC nicht belegen. Andere Mechanismen müssen dazu führen, dass der immunologisch vermittelte Leberschaden nicht effektiv verhindert wird. Bei den PSC-Patienten zeigten sich in vielen Fällen niedrige Zellzahlen im Entzündungsinfiltrat. Ob diese Unterschiede, insbesondere in Hinblick auf die signifikant geringere Anzahl von Foxp3+ T-Zellen mit der niedrigeren Entzün-

dungsaktivität zusammenhängen oder eine pathogenetische Rolle in der PSC spielen, lässt sich dabei noch nicht abschließend beantworten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen Unterschiede zwischen den jeweiligen autoimmunen Hepatopathien. Sie leisten einen wichtigen Beitrag zur Diskussion um Anzahl, Lokalisation und Funktion regulatorischer T-Zellen bei diesen Erkrankungen und zeigen multiple Ansatzpunkte für anschließende Arbeiten.

## Literaturverzeichnis

- Altman, D. G. und Bland, J. M. (1995). "Statistics notes: The normal distribution." *BMJ* **310**(6975): 298.
- Altman, D. G. und Bland, J. M. (1996). "Statistics Notes: Comparing several groups using analysis of variance." *BMJ* **312**(7044): 1472-1473.
- Altman, D. G. und Bland, J. M. (2009). "Parametric v non-parametric methods for data analysis." *BMJ* **338**: a3167.
- Alvarez, F., Berg, P. A., Bianchi, F. B., Bianchi, L., Burroughs, A. K., Cancado, E. L., Chapman, R. W., Cooksley, W. G. E., Czaja, A. J., Desmet, V. J., Donaldson, P. T., Eddleston, A. L. W. F., Fainboim, L., Heathcote, J., Homberg, J. C., Hoofnagle, J. H., Kakumu, S., Krawitt, E. L., Mackay, I. R., MacSween, R. N. M., Maddrey, W. C., Manns, M. P., McFarlane, I. G., Meyer zum Büschenfelde, K. H., Mieli-Vergani, G., Nakanuma, Y., Nishioka, M., Penner, E., Porta, G., Portmann, B. C., Reed, W. D., Rodes, J., Schalm, S. W., Scheuer, P. J., Schrupf, E., Seki, T., Toda, G., Tsuji, T., Tygstrup, N., Vergani, D. und Zeniya, M. (1999). "International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis." *Journal of Hepatology* **31**(5): 929-938.
- Amanzada, A., Malik, I., Nischwitz, M., Sultan, S., Naz, N. und Ramadori, G. (2011). "Myeloperoxidase and elastase are only expressed by neutrophils in normal and in inflamed liver." *Histochemistry and Cell Biology* **135**(3): 305-315.
- Angulo, P., Peter, J. B., Gershwin, M. E., DeSotel, C. K., Shoenfeld, Y., Ahmed, A. E. E. und Lindor, K. D. (2000). "Serum autoantibodies in patients with primary sclerosing cholangitis." *Journal of Hepatology* **32**(2): 182-187.
- Arber, D. A., Snyder, D. S., Fine, M., Dagens, A., Niland, J. und Slovak, M. L. (2001). "Myeloperoxidase Immunoreactivity in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia." *American Journal of Clinical Pathology* **116**(1): 25-33.
- Aron, J. und Bowlus, C. (2009). "The immunobiology of primary sclerosing cholangitis." *Seminars in Immunopathology* **31**(3): 383-397.
- Baecher-Allan, C., Brown, J. A., Freeman, G. J. und Hafler, D. A. (2001). "CD4+CD25high Regulatory Cells in Human Peripheral Blood." *The Journal of Immunology* **167**(3): 1245-1253.
- Baecher-Allan, C., Viglietta, V. und Hafler, D. A. (2002). "Inhibition of Human CD4+CD25+high Regulatory T Cell Function." *The Journal of Immunology* **169**(11): 6210-6217.
- Bambha, K., Kim, W. R., Talwalkar, J., Torgerson, H., Benson, J. T., Therneau, T. M., Loftus Jr, E. V., Yawn, B. P., Dickson, E. R. und Melton III, L. J. (2003). "Incidence, clinical spectrum, and outcomes of primary sclerosing cholangitis in a united states community." *Gastroenterology* **125**(5): 1364-1369.
- Bates, G. J., Fox, S. B., Han, C., Leek, R. D., Garcia, J. F., Harris, A. L. und Banham, A. H. (2006). "Quantification of Regulatory T Cells Enables the Identification of High-Risk Breast Cancer Patients and Those at Risk of Late Relapse." *J Clin Oncol* **24**(34): 5373-5380.
- Belkaid, Y. (2007). "Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity." *Nat Rev Immunol* **7**(11): 875-888.
- Bellentani, S., Tiribelli, C., Saccoccio, G., Sodde, M., Fratti, N., De Martin, C. und Cristianini, G. (1994). "Prevalence of chronic liver disease in the general population of northern Italy: the Dionysos Study." *Hepatology* **20**(6): 1442-9.
- Bender, R., Grouven, U. und Ziegler, A. (2007a). "Analysis of variance for repeated measurements." *Dtsch Med Wochenschr* **132** Suppl 1(1): e61-4.

- Bender, R., Lange, S. und Ziegler, A. (2007b). "Multiple testing." Dtsch Med Wochenschr **132 Suppl 1**(1): e26-9.
- Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L., Kelly, T. E., Saulsbury, F. T., Chance, P. F. und Ochs, H. D. (2001). "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3." Nat Genet **27**(1): 20-21.
- Berry, D. A. (1987). "Logarithmic transformations in ANOVA." Biometrics. **43**(2): 439-56.
- Besredka, A. M. (1909). "De L'Anaphylaxie. Sixieme memoire de l'anaphylaxie lactique." Ann. Institute Pasteur **23**: 166.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L. und Kuchroo, V. K. (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." Nature **441**(7090): 235-238.
- Björnsson, E., Olsson, R., Bergquist, A., Lindgren, S., Braden, B., Chapman, R. W., Boberg, K. M. und Angulo, P. (2008). "The Natural History of Small-Duct Primary Sclerosing Cholangitis." Gastroenterology **134**(4): 975-980.
- Bland, J. M. und Altman, D. G. (1995). "Multiple significance tests: the Bonferroni method." BMJ **310**(6973): 170.
- Boberg, K. M., Fausa, O., Haaland, T., Holter, E., Mellbye, O. J., Spurkland, A. und Schrumpf, E. (1996). "Features of autoimmune hepatitis in primary sclerosing cholangitis: An evaluation of 114 primary sclerosing cholangitis patients according to a scoring system for the diagnosis of autoimmune hepatitis." Hepatology **23**(6): 1369-1376.
- Böcker, W., Heitz, P. U. und Aguzzi, A. (2008). Pathologie. München [u.a.], Elsevier, Urban & Fischer.
- Boenisch, T. und Henne, C. (2003). Handbuch immunchemische Färbemethoden. Hamburg.
- Bolacchi, F., Sinistro, A., Ciaprini, C., Demin, F., Capozzi, M., Carducci, F. C., Drapeau, C. M. J., Rocchi, G. und Bergamini, A. (2006). "Increased hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD4+ T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels." Clinical & Experimental Immunology **144**(2): 188-196.
- Bowlus, C. (2010). "Cutting Edge Issues in Primary Sclerosing Cholangitis." Clinical Reviews in Allergy and Immunology: 1-12.
- Brunkow, M. E., Jeffery, E. W., Hjerrild, K. A., Paeper, B., Clark, L. B., Yasayko, S.-A., Wilkinson, J. E., Galas, D., Ziegler, S. F. und Ramsdell, F. (2001). "Disruption of a new fork-head/winged-helix protein, scurf1, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse." Nat Genet **27**(1): 68-73.
- Brunt, E. M., Janney, C. G., Di Bisceglie, A. M., Neuschwander-Tetri, B. A. und Bacon, B. R. (1999). "Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions." Am J Gastroenterol **94**(9): 2467-2474.
- Brunt, E. M. und Tiniakos, D. G. (2010). "Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease." World **16**(42): 5286-96.
- Buckner, J. H. (2010). "Mechanisms of impaired regulation by CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in human autoimmune diseases." Nat Rev Immunol **10**(12): 849-859.
- Cabrera, R., Tu, Z., Xu, Y., Firpi, R. J., Rosen, H. R., Liu, C. und Nelson, D. R. (2004). "An immunomodulatory role for CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection." Hepatology **40**(5): 1062-1071.
- Cameron, R. G., Blendis, L. M. und Neuman, M. G. (2001). "Accumulation of macrophages in primary sclerosing cholangitis." Clinical Biochemistry **34**(3): 195-201.

- Cao, D., Malmström, V., Baecher-Allan, C., Hafler, D., Klareskog, L. und Trollmo, C. (2003). "Isolation and functional characterization of regulatory CD25brightCD4+ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis." European Journal of Immunology **33**(1): 215-223.
- Cao, D., Börjesson, O., Larsson, P., Rudin, A., Gunnarsson, I., Klareskog, L., Malmström, V. und Trollmo, C. (2006). "Foxp3 identifies Regulatory CD25bright,CD4+ T Cells in Rheumatic Joints." Scandinavian Journal of Immunology **63**(6): 444-452.
- Carambia, A. und Herkel, J. (2009). "CD4 T cells in hepatic immune tolerance." Journal of Autoimmunity **34**(1): 23-28.
- Cava, A. L., Kaer, L. V. und Fu Dong, S. (2006). "CD4+CD25+ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators." Trends in Immunology **27**(7): 322-327.
- Chapman, R. W., Arborgh, B. A., Rhodes, J. M., Summerfield, J. A., Dick, R., Scheuer, P. J. und Sherlock, S. (1980). "Primary sclerosing cholangitis: a review of its clinical features, cholangiography, and hepatic histology." Gut, **21**(10): 870-7.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.-j., Li, L., Marinos, N., McGrady, G. und Wahl, S. M. (2003). "Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- $\beta$  Induction of Transcription Factor Foxp3." J. Exp. Med. **198**(12): 1875-1886.
- Chitturi, S. und Farrell, G. C. (2001). "Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis." Semin Liver Dis. **21**(1): 27-41.
- Clark, J. M., Brancati, F. L. und Diehl, A. M. (2003). "The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States." Am J Gastroenterol **98**(5): 960-967.
- Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R. S. und Vignali, D. A. A. (2007). "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function." Nature **450**(7169): 566-569.
- Corpechot, C., Carrat, F., Bahr, A., Chrétien, Y., Poupon, R.-E. und Poupon, R. (2005). "The effect of ursodeoxycholic acid therapy on the natural course of primary biliary cirrhosis." Gastroenterology **128**(2): 297-303.
- Cotler, S. J., Kanji, K., Keshavarzian, A., Jensen, D. M. und Jakate, S. (2004). "Prevalence and Significance of Autoantibodies in Patients With Non-Alcoholic Steatohepatitis." Journal of Clinical Gastroenterology **38**(9): 801-804.
- Crispe, I. N. (1999). T lymphocytes in the liver. Immunobiology, pathology, and host defense. New York [u.a.], Wiley-Liss.
- Crispin, J. C., Martínez, A. und Alcocer-Varela, J. (2003). "Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus." Journal of Autoimmunity **21**(3): 273-276.
- Crosignani, A., Battezzati, P. M., Invernizzi, P., Selmi, C., Prina, E. und Podda, M. (2008). "Clinical features and management of primary biliary cirrhosis." World J Gastroenterol. **14**(21): 3313-27.
- Czaja, A. J. (1984). "Natural History, Clinical Features, and Treatment of Autoimmune Hepatitis." Semin Liver Dis **4**(01): 1,12.
- Czaja, A. J. (2010). "Difficult treatment decisions in autoimmune hepatitis." World J Gastroenterol **16**(8): 934-47.
- Czaja, A. J. und Manns, M. P. (2010). "Advances in the Diagnosis, Pathogenesis, and Management of Autoimmune Hepatitis." Gastroenterology **139**(1): 58-72.e4.
- Dave, M., Elmunzer, B. J., Dwamena, B. A. und Higgins, P. D. R. (2010). "Primary Sclerosing Cholangitis: Meta-Analysis of Diagnostic Performance of MR Cholangiopancreatography." Radiology **256**(2): 387-396.

- Day, C. P. und James, O. F. (1998). "Steatohepatitis: a tale of two "hits"?" Gastroenterology **114**(4): 842-5.
- De Groote, J., Fevery, J. und Lepoutre, L. (1978). "Long-term follow-up of chronic active hepatitis of moderate severity." Gut **19**(6): 510-3.
- Demirkiran, A., Kok, A., Kwekkeboom, J., Metselaar, H. J., Tilanus, H. W. und van der Laan, L. J. W. (2005). "Decrease of CD4+CD25+ T Cells in Peripheral Blood After Liver Transplantation: Association With Immunosuppression." Transplantation Proceedings **37**(2): 1194-1196.
- Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T. und Schuler, G. (2001). "Ex Vivo Isolation and Characterization of CD4+CD25+ T Cells with Regulatory Properties from Human Blood." The Journal of Experimental Medicine **193**(11): 1303-1310.
- Diehl, A. M., Goodman, Z. und Ishak, K. G. (1988). "Alcohollike liver disease in nonalcoholics. A clinical and histologic comparison with alcohol-induced liver injury." Gastroenterology **95**(4): 1056-62.
- DiPaolo, R. J., Brinster, C., Davidson, T. S., Andersson, J., Glass, D. und Shevach, E. M. (2007). "Autoantigen-Specific TGF- $\beta$ -Induced Foxp3+ Regulatory T Cells Prevent Autoimmunity by Inhibiting Dendritic Cells from Activating Autoreactive T Cells." The Journal of Immunology **179**(7): 4685-4693.
- Donaldson, P., Doherty, D., Underhill, J. und Williams, R. (1994). "The molecular genetics of autoimmune liver disease." Hepatology **20**(1 Pt 1): 225-39.
- Duclos-Vallée, J.-C., Sebagh, M., Rifai, K., Johanet, C., Ballot, E., Guettier, C., Karam, V., Hurtova, M., Feray, C., Reynes, M., Bismuth, H. und Samuel, D. (2003). "A 10 year follow up study of patients transplanted for autoimmune hepatitis: histological recurrence precedes clinical and biochemical recurrence." Gut **52**(6): 893-897.
- Eksteen, B., Grant, A. J., Miles, A., Curbishley, S. M., Lalor, P. F., Hubscher, S. G., Briskin, M., Salmon, M. und Adams, D. H. (2004). "Hepatic endothelial CCL25 mediates the recruitment of CCR9+ gut-homing lymphocytes to the liver in primary sclerosing cholangitis." J Exp Med **200**(11): 1511-7. Epub 2004 Nov 22.
- Emoto, M. und Kaufmann, S. H. E. (2003). "Liver NKT cells: an account of heterogeneity." Trends in Immunology **24**(7): 364-369.
- Erhardt, A., Biburger, M., Papadopoulos, T. und Tiegs, G. (2007). "IL-10, regulatory T cells, and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver injury in mice." Hepatology **45**(2): 475-485.
- Exley, M. A. und Koziel, M. J. (2004). "To be or not to be NKT: Natural killer T cells in the liver." Hepatology **40**(5): 1033-1040.
- Fahlén, L., Read, S., Gorelik, L., Hurst, S. D., Coffman, R. L., Flavell, R. A. und Powrie, F. (2005). "T cells that cannot respond to TGF- $\beta$  escape control by CD4+CD25+ regulatory T cells." The Journal of Experimental Medicine **201**(5): 737-746.
- Faria, A. M. und Weiner, H. L. (2006). "Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases." Clin Dev Immunol **13**(2-4): 143-57.
- Faria, A. M. C. und Weiner, H. L. (2005). "Oral tolerance." Immunological Reviews **206**(1): 232-259.
- Ferri, S., Longhi, M. S., De Molo, C., Lalanne, C., Muratori, P., Granito, A., Hussain, M. J., Ma, Y., Lenzi, M., Mieli-Vergani, G., Bianchi, F. B., Vergani, D. und Muratori, L. (2010). "A multifaceted imbalance of T cells with regulatory function characterizes type 1 autoimmune hepatitis." Hepatology **52**(3): 999-1007.
- Fischer, L., Klempnauer, J., Beckebaum, S., Metselaar, H. J., Neuhaus, P., Schemmer, P., Settmacher, U., Heyne, N., Clavien, P. A., Muehlbacher, F., Morard, I., Wolters, H., Vogel, W., Becker, T., Sterneck, M., Lehner, F., Klein, C., Kazemier, G., Pascher, A., Schmidt, J.,

- Rauchfuss, F., Schnitzbauer, A., Nadalin, S., Hack, M., Ladenburger, S. und Schlitt, H. J. (2012). "A Randomized, Controlled Study to Assess the Conversion from Calcineurin-Inhibitors to Everolimus After Liver Transplantation—PROTECT." American Journal of Transplantation: no-no.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A. und Rudensky, A. Y. (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." Nat Immunol **4**(4): 330-336.
- Fontenot, J. D. und Rudensky, A. Y. (2005). "A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3." Nat Immunol **6**(4): 331-337.
- Furuno, K., Yuge, T., Kusuhara, K., Takada, H., Nishio, H., Khajooe, V., Ohno, T. und Hara, T. (2004). "CD25+CD4+ regulatory T cells in patients with Kawasaki disease." The Journal of Pediatrics **145**(3): 385-390.
- Garin, M. I., Chu, C.-C., Golshayan, D., Cernuda-Morollon, E., Wait, R. und Lechler, R. I. (2007). "Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells." Blood **109**(5): 2058-2065.
- Gavin, M. A., Torgerson, T. R., Houston, E., deRoos, P., Ho, W. Y., Stray-Pedersen, A. r., Ocheltree, E. L., Greenberg, P. D., Ochs, H. D. und Rudensky, A. Y. (2006). "Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(17): 6659-6664.
- Gershon, R. K. und Kondo, K. (1970). "Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes." Immunology **18**(5): 723-37.
- Gershon, R. K. und Kondo, K. (1971). "Infectious immunological tolerance." Immunology **21**(6): 903-14.
- Girardi, M. (2005). "Immunosurveillance and Immunoregulation by  $\gamma\delta$  T Cells." J Invest Dermatol **126**(1): 25-31.
- Gong, Y., Huang, Z. B., Christensen, E. und Gluud, C. (2008). "Ursodeoxycholic acid for primary biliary cirrhosis." Cochrane Database Syst Rev **16**(3): CD000551.
- Graca, L., Chen, T.-C., Moine, A. L., Cobbold, S. P., Howie, D. und Waldmann, H. (2005). "Dominant tolerance: activation thresholds for peripheral generation of regulatory T cells." Trends in Immunology **26**(3): 130-135.
- Grant, A. J., Goddard, S., Ahmed-Choudhury, J., Reynolds, G., Jackson, D. G., Briskin, M., Wu, L., Hübscher, S. G. und Adams, D. H. (2002a). "Hepatic Expression of Secondary Lymphoid Chemokine (CCL21) Promotes the Development of Portal-Associated Lymphoid Tissue in Chronic Inflammatory Liver Disease." The American Journal of Pathology **160**(4): 1445-1455.
- Grant, A. J., Lalor, P. F., Salmi, M., Jalkanen, S. und Adams, D. H. (2002b). "Homing of mucosal lymphocytes to the liver in the pathogenesis of hepatic complications of inflammatory bowel disease." The Lancet **359**(9301): 150-157.
- Graziadei, I. W., Wiesner, R. H., Marotta, P. J., Porayko, M. K., Hay, J. E., Charlton, M. R., Poterucha, J. J., Rosen, C. B., Gores, G. J., LaRusso, N. F. und Krom, R. A. F. (1999). "Long-term results of patients undergoing liver transplantation for primary sclerosing cholangitis." Hepatology **30**(5): 1121-1127.
- Gregorio, G. V., Portmann, B., Karani, J., Harrison, P., Donaldson, P. T., Vergani, D. und Mieli-Vergani, G. (2001). "Autoimmune hepatitis/sclerosing cholangitis overlap syndrome in childhood: A 16-year prospective study." Hepatology **33**(3): 544-553.
- Gross, R. G. und Odin, J. A. (2008). "Recent Advances in the Epidemiology of Primary Biliary Cirrhosis." Clinics in Liver Disease **12**(2): 289-303.

- Grossman, W. J., Verbsky, J. W., Barchet, W., Colonna, M., Atkinson, J. P. und Ley, T. J. (2004). "Human T Regulatory Cells Can Use the Perforin Pathway to Cause Autologous Target Cell Death." *Immunity* **21**(4): 589-601.
- Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M. und Weaver, C. T. (2005). "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." *Nat Immunol* **6**(11): 1123-1132.
- Harrison, S. A., Torgerson, S., Hayashi, P., Ward, J. und Schenker, S. (2003). "Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis." *Am J Gastroenterol* **98**(11): 2485-2490.
- Heathcote, E. J., Cauch-Dudek, K., Walker, V., Bailey, R. J., Blendis, L. M., Ghent, C. N., Michieletti, P., Minuk, G. Y., Pappas, S. C., Scully, L. J. und et al. (1994). "The Canadian Multicenter Double-blind Randomized Controlled Trial of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis." *Hepatology* **19**(5): 1149-56.
- Hennes, E. M., Zeniya, M., Czajam, A. J., Parés, A., Dalekos, G. N., Krawitt, E. L., Bittencourt, P. L., Porta, G., Boberg, K. M., Hofer, H., Bianchi, F. B., Shibata, M., Schramm, C., de Torres, B. E., Galle, P. R., McFarlane, I., Dienes, H.-P., Lohse, A. W. und International Auto-immune Hepatitis Group (2008). "Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis." *Hepatology* **48**(1): 169-176.
- Herkel, J., Jagemann, B., Wiegand, C., Lazaro, J. F. G., Lueth, S., Kanzler, S., Blessing, M., Schmitt, E. und Lohse, A. W. (2003). "MHC class II-expressing hepatocytes function as antigen-presenting cells and activate specific CD4 T lymphocytes." *Hepatology* **37**(5): 1079-1085.
- Hirschfield, G. M. und Heathcote, E. J. (2008). "Antimitochondrial Antibody-Negative Primary Biliary Cirrhosis." *Clinics in Liver Disease* **12**(2): 323-331.
- Hori, S., Nomura, T. und Sakaguchi, S. (2003). "Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3." *Science* **299**(5609): 1057-1061.
- Huang, H., Dawicki, W., Zhang, X., Town, J. und Gordon, J. R. (2010). "Tolerogenic Dendritic Cells Induce CD4+CD25hiFoxp3+ Regulatory T Cell Differentiation from CD4+CD25-/loFoxp3- Effector T Cells." *The Journal of Immunology* **185**(9): 5003-5010.
- Huber, S., Schramm, C., Lehr, H. A., Mann, A., Schmitt, S., Becker, C., Protschka, M., Galle, P. R., Neurath, M. F. und Blessing, M. (2004). "Cutting Edge: TGF- $\beta$  Signaling Is Required for the In Vivo Expansion and Immunosuppressive Capacity of Regulatory CD4+CD25+ T Cells." *J Immunol* **173**(11): 6526-6531.
- Huber, S., Stahl, F. R., Schrader, J., Luth, S., Presser, K., Carambia, A., Flavell, R. A., Werner, S., Blessing, M., Herkel, J. und Schramm, C. (2009). "Activin A Promotes the TGF- $\beta$ -Induced Conversion of CD4+CD25- T Cells into Foxp3+ Induced Regulatory T Cells." *J Immunol* **182**(8): 4633-4640.
- Hübscher, S. G. (2006). "Histological assessment of non-alcoholic fatty liver disease." *Histopathology* **49**(5): 450-465.
- Huter, E. N., Punkosdy, G. A., Glass, D. D., Cheng, L. I., Ward, J. M. und Shevach, E. M. (2008). "TGF- $\beta$ -induced Foxp3+ regulatory T cells rescue scurfy mice." *European Journal of Immunology* **38**(7): 1814-1821.
- Ichiki, Y., Shimoda, S., Ishibashi, H. und Gershwin, M. E. (2004). "Is primary biliary cirrhosis a model autoimmune disease?" *Autoimmunity Reviews* **3**(4): 331-336.
- Ichiki, Y., Aoki, C. A., Bowlus, C. L., Shimoda, S., Ishibashi, H. und Gershwin, M. E. (2005). "T cell immunity in autoimmune hepatitis." *Autoimmunity Reviews* **4**(5): 315-321.
- Iczkowski, K. A., Cheng, L., Crawford, B. G. und Bostwick, D. G. (1999). "Steam heat with an EDTA buffer and protease digestion optimizes immunohistochemical expression of basal cell-specific antikeratin 34betaE12 to discriminate cancer in prostatic epithelium." *Mod Pathol* **12**(1): 1-4.

- Ishak, K. G. und Zimmerman, H. J. (1995). "Morphologic spectrum of drug-induced hepatic disease." Gastroenterol Clin North Am **24**(4): 759-86.
- Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F. und Sakaguchi, S. (1999). "Thymus and Autoimmunity: Production of CD25+CD4+ Naturally Anergic and Suppressive T Cells as a Key Function of the Thymus in Maintaining Immunologic Self-Tolerance." The Journal of Immunology **162**(9): 5317-5326.
- Jacob, D. A., Bahra, M., Schmidt, S. C., Schumacher, G., Weimann, A., Neuhaus, P. und Neumann, U. P. (2008). "Mayo risk score for primary biliary cirrhosis: a useful tool for the prediction of course after liver transplantation?" Ann Transplant. **13**(3): 35-42.
- Jonuleit, H. und Schmitt, E. (2003). "The Regulatory T Cell Family: Distinct Subsets and their Interrelations." The Journal of Immunology **171**(12): 6323-6327.
- Kanzler, S., Weidemann, C., Gerken, G., Löhr, H. F., Galle, P. R., Büschenfelde, K.-H. M. z. und Lohse, A. W. (1999). "Clinical significance of autoantibodies to soluble liver antigen in autoimmune hepatitis." Journal of Hepatology **31**(4): 635-640.
- Kanzler, S., Löhr, H., Gerken, G., Galle, P. R. und Lohse, A. W. (2001). "Long-term management and prognosis of autoimmune hepatitis (AIH): A single center experience." Z Gastroenterol **39**(05): 339,348.
- Kaplan, M. M. und Gershwin, M. E. (2005). "Primary Biliary Cirrhosis." New England Journal of Medicine **353**(12): 1261-1273.
- Khattari, R., Cox, T., Yasayko, S.-A. und Ramsdell, F. (2003). "An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells." Nat Immunol **4**(4): 337-342.
- Kim, W. R., Poterucha, J. J., Porayko, M. K., Dickson, E. R., Steers, J. L. und Wiesner, R. H. (1996). "Recurrence of Nonalcoholic Steatohepatitis Following Liver Transplantation 1." Transplantation **62**(12): 1802-1805.
- Kita, H., Matsumura, S., He, X. S., Ansari, A. A., Lian, Z. X., Van de Water, J., Coppel, R. L., Kaplan, M. M. und Gershwin, M. E. (2002). "Quantitative and functional analysis of PDC-E2-specific autoreactive cytotoxic T lymphocytes in primary biliary cirrhosis." J Clin Invest. **109**(9): 1231-40.
- Klugewitz, K., Blumenthal-Barby, F., Schrage, A., Knolle, P. A., Hamann, A. und Crispe, I. N. (2002). "Immunomodulatory Effects of the Liver: Deletion of Activated CD4+ Effector Cells and Suppression of IFN- $\gamma$ -Producing Cells After Intravenous Protein Immunization." The Journal of Immunology **169**(5): 2407-2413.
- Klugewitz, K., Adams, D. H., Emoto, M., Eulenburg, K. und Hamann, A. (2004). "The composition of intrahepatic lymphocytes: shaped by selective recruitment?" Trends in Immunology **25**(11): 590-594.
- Knolle, P., Schlaak, J., Uhrig, A., Kempf, P., Meyer zum Buschenfelde, K. H. und Gerken, G. (1995). "Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge." J Hepatol **22**(2): 226-9.
- Knolle, P. A., Schmitt, E., Jin, S., Germann, T., Duchmann, R., Hegenbarth, S., Gerken, G. und Lohse, A. W. (1999). "Induction of cytokine production in naive CD4+ T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells." Gastroenterology **116**(6): 1428-1440.
- Koyabu, M., Uchida, K., Miyoshi, H., Sakaguchi, Y., Fukui, T., Ikeda, H., Takaoka, M., Hirohara, J., Nishio, A., Uemura, Y., Uemoto, S. und Okazaki, K. (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**(7): 732-741.
- Krawitt, E. L. (2006). "Autoimmune Hepatitis." New England Journal of Medicine **354**(1): 54-66.
- Lan, R. Y., Ansari, A. A., Lian, Z.-X. und Gershwin, M. E. (2005). "Regulatory T cells: Development, function and role in autoimmunity." Autoimmunity Reviews **4**(6): 351-363.

- Lan, R. Y., Cheng, C., Lian, Z.-X., Tsuneyama, K., Yang, G.-X., Moritoki, Y., Chuang, Y.-H., Nakamura, T., Saito, S., Shimoda, S., Tanaka, A., Bowlus, C. L., Takano, Y., Ansari, A. A., Coppel, R. L. und Gershwin, M. E. (2006). "Liver-targeted and peripheral blood alterations of regulatory T cells in primary biliary cirrhosis." *Hepatology* **43**(4): 729-737.
- Lapierre, P., Béland, K., Martin, C. und Alvarez, F. (2010). "Forkhead box p3+ regulatory T cell underlies male resistance to experimental type 2 autoimmune hepatitis." *Hepatology* **51**(5): 1789-1798.
- LaRusso, N. F., Shneider, B. L., Black, D., Gores, G. J., James, S. P., Doo, E. und Hoofnagle, J. H. (2006). Primary sclerosing cholangitis: Summary of a workshop, Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company. **44**: 746-764.
- Lau, S. K., Chu, P. G. und Weiss, L. M. (2004). "CD163." *American Journal of Clinical Pathology* **122**(5): 794-801.
- Leuschner, U. (2003). "Primary biliary cirrhosis--presentation and diagnosis." *Clin Liver Dis.* **7**(4): 741-58.
- Liang, S., Alard, P., Zhao, Y., Parnell, S., Clark, S. L. und Kosiewicz, M. M. (2005). "Conversion of CD4+ CD25- cells into CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo requires B7 costimulation, but not the thymus." *The Journal of Experimental Medicine* **201**(1): 127-137.
- Lindor, K. D. (1997). "Ursodiol for Primary Sclerosing Cholangitis." *New England Journal of Medicine* **336**(10): 691-695.
- Lindor, K. D., Kowdley, K. V., Heathcote, E. J., Harrison, M. E., Jorgensen, R., Angulo, P., Lymp, J. F., Burgart, L. und Colin, P. (2004). Ursodeoxycholic acid for treatment of nonalcoholic steatohepatitis: Results of a randomized trial, Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company. **39**: 770-778.
- Lohse, A. W., Knolle, P. A., Bilo, K., Uhrig, A., Waldmann, C., Ibe, M., Schmitt, E., Gerken, G. und Meyer Zum Buschenfelde, K. H. (1996). "Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells." *Gastroenterology* **110**(4): 1175-1181.
- Lohse, A. W., Weiler-Normann, C. und Tiegs, G. (2009). "Immune-mediated liver injury." *Journal of Hepatology* **52**(1): 136-144.
- Lohse, A. W. und Mieli-Vergani, G. (2011). "Autoimmune hepatitis." *Journal of Hepatology* **55**(1): 171-182.
- Longerich, T., Flechtenmacher, C. und Schirmacher, P. (2008). "Maß und Zahl in der Hepatopathologie." *Der Pathologe* **29**(1): 15-26.
- Longhi, M. S., Ma, Y., Bogdanos, D. P., Cheeseman, P., Mieli-Vergani, G. und Vergani, D. (2004). "Impairment of CD4+CD25+ regulatory T-cells in autoimmune liver disease." *Journal of Hepatology* **41**(1): 31-37.
- Longhi, M. S., Hussain, M. J., Mitry, R. R., Arora, S. K., Mieli-Vergani, G., Vergani, D. und Ma, Y. (2006). "Functional Study of CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Health and Autoimmune Hepatitis." *J Immunol* **176**(7): 4484-4491.
- Longhi, M. S., Hussain, M. J., Bogdanos, D. P., Quaglia, A., Mieli-Vergani, G., Ma, Y. und Vergani, D. (2007). "Cytochrome P450IID6-specific CD8 T cell immune responses mirror disease activity in autoimmune hepatitis type 2." *Hepatology* **46**(2): 472-484.
- Longhi, M. S., Hussain, M. J., Kwok, W. W., Mieli-Vergani, G., Ma, Y. und Vergani, D. (2010a). "Autoantigen-specific regulatory T cells, a potential tool for immune-tolerance reconstitution in type-2 autoimmune hepatitis." *Hepatology* **53**(2): 536-547.
- Longhi, M. S., Ma, Y., Mieli-Vergani, G. und Vergani, D. (2010b). "Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis." *Journal of Autoimmunity* **34**(1): 7-14.

- Ludwig, J., Dickson, E. R. und McDonald, G. S. (1978). "Staging of chronic nonsuppurative destructive cholangitis (syndrome of primary biliary cirrhosis)." Virchows Arch A Pathol Anat Histol **379**(2): 103-12.
- Ludwig, J., Viggiano, T. R., McGill, D. B. und Oh, B. J. (1980). "Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease." Mayo Clin Proc **55**(7): 434-8.
- Ludwig, J., Barham, S. S., LaRusso, N. F., Elveback, L. R., Wiesner, R. H. und McCall, J. T. (1981). "Morphologic features of chronic hepatitis associated with primary sclerosing cholangitis and chronic ulcerative colitis." Hepatology **1**(6): 632-40.
- Ludwig, J. (2000). "The pathology of primary biliary cirrhosis and autoimmune cholangitis." Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol **14**(4): 601-13.
- Lüth, S., Herkel, J., Kanzler, S., Frenzel, C., Galle, P. R., Dienes, H. P., Schramm, C. und Lohse, A. W. (2008a). "Serologic Markers Compared With Liver Biopsy for Monitoring Disease Activity in Autoimmune Hepatitis." Journal of Clinical Gastroenterology **42**(8): 926-930  
10.1097/MCG.0b013e318154af74.
- Lüth, S., Huber, S., Schramm, C., Buch, T., Zander, S., Stadelmann, C., Brück, W., Wraith, D. C., Herkel, J. und Lohse, A. W. (2008b). "Ectopic expression of neural autoantigen in mouse liver suppresses experimental autoimmune neuroinflammation by inducing antigen-specific Tregs." The Journal of Clinical Investigation **118**(10): 3403-3410.
- Lüth, S., Weiler-Normann, C., Schramm, C. und Lohse, A. W. (2009). "Autoimmunerkrankungen der Leber." Der Internist **50**(3): 310-317.
- Luther, C., Adamopoulou, E., Stoeckle, C., Brucklacher-Waldert, V., Rosenkranz, D., Stoltze, L., Lauer, S., Poeschel, S., Melms, A. und Tolosa, E. (2009). "Prednisolone Treatment Induces Tolerogenic Dendritic Cells and a Regulatory Milieu in Myasthenia Gravis Patients." The Journal of Immunology **183**(2): 841-848.
- Ma, Y., Bogdanos, D. P., Hussain, M. J., Underhill, J., Bansal, S., Longhi, M. S., Cheeseman, P., Mieli-Vergani, G. und Vergani, D. (2006). "Polyclonal T-Cell Responses to Cytochrome P450IID6 Are Associated With Disease Activity in Autoimmune Hepatitis Type 2." Gastroenterology **130**(3): 868-882.
- Mahjoub, F. E., Khairkhal, R. H., Sani, M. N., Irvanloo, G. und Monajemzadeh, M. (2008). "CD 56 staining in liver biopsies does not help in differentiating extrahepatic biliary atresia from other causes of neonatal cholestasis." Diagn Pathol **3**: 10.
- Malek, T. R. und Bayer, A. L. (2004). "Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2." Nat Rev Immunol **4**(9): 665-674.
- Maloy, K. J., Salaun, L., Cahill, R., Dougan, G., Saunders, N. J. und Powrie, F. (2003). "CD4+CD25+ TR Cells Suppress Innate Immune Pathology Through Cytokine-dependent Mechanisms." The Journal of Experimental Medicine **197**(1): 111-119.
- Manavalan, J. S., Kim-Schulze, S., Scotto, L., Naiyer, A. J., Vlad, G., Colombo, P. C., Marboe, C., Mancini, D., Cortesini, R. und Suci-Foca, N. (2004). "Alloantigen specific CD8+CD28<sup>hi</sup> FOXP3+ T suppressor cells induce ILT3+ ILT4+ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity." International Immunology **16**(8): 1055-1068.
- Manns, M., Gerken, G., Kyriatsoulis, A., Staritz, M. und Meyer zum Buschenfelde, K. H. (1987). "Characterisation of a new subgroup of autoimmune chronic active hepatitis by autoantibodies against a soluble liver antigen." Lancet **1**(8528): 292-4.
- Manns, M. P., Czaja, A. J., Gorham, J. D., Krawitt, E. L., Mieli-Vergani, G., Vergani, D. und Vierling, J. M. (2010). "Diagnosis and management of autoimmune hepatitis." Hepatology **51**(6): 2193-2213.
- Mao, T. K., Davis, P. A., Odin, J. A., Coppel, R. L. und Gershwin, M. E. (2004). "Sidechain biology and the immunogenicity of PDC-E2, the major autoantigen of primary biliary cirrhosis." Hepatology **40**(6): 1241-1248.

- Marazuela, M., Garcia-Lopez, M. A., Figueroa-Vega, N., de la Fuente, H., Alvarado-Sanchez, B., Monsivais-Urenda, A., Sanchez-Madrid, F. und Gonzalez-Amaro, R. (2006). "Regulatory T Cells in Human Autoimmune Thyroid Disease." J Clin Endocrinol Metab **91**(9): 3639-3646.
- Misra, N., Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S. b., Kazatchkine, M. D. und Kaveri, S. V. (2004). "Cutting Edge: Human CD4+CD25+ T Cells Restrain the Maturation and Antigen-Presenting Function of Dendritic Cells." The Journal of Immunology **172**(8): 4676-4680.
- Miyara, M., Wing, K. und Sakaguchi, S. (2009a). "Therapeutic approaches to allergy and autoimmunity based on FoxP3+ regulatory T-cell activation and expansion." The Journal of allergy and clinical immunology **123**(4): 749-755.
- Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., Mathian, A., Nakahata, T., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ono, M., Amoura, Z., Gorochov, G. und Sakaguchi, S. (2009b). "Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4+ T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor." Immunity **30**(6): 899-911.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M., Ehrenstein, M. und Janeway, C. (2008). Janeway's immunobiology. New York, NY [u.a.], Garland Science.
- Mutimer, D. J., Fussey, S. P., Yeaman, S. J., Kelly, P. J., James, O. F. und Bassendine, M. F. (1989). "Frequency of IgG and IgM autoantibodies to four specific M2 mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis." Hepatology. **10**(4): 403-7.
- Nair, S., Diehl, A. M., Wiseman, M., Farr, G. H. und Perrillo, R. P. (2004). "Metformin in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a pilot open label trial." Alimentary Pharmacology & Therapeutics **20**(1): 23-28.
- Nakanuma, Y. und Zen, Y. (2007). "Pathology and immunopathology of immunoglobulin G4-related sclerosing cholangitis: The latest addition to the sclerosing cholangitis family." Hepatology Research **37**: S478-S486.
- Nensi, A. und Chandok, N. (2012). "Causes of death after liver transplantation." Ann Hepatol **11**(3): 415-7.
- Neuberger, J. (2003). "Liver transplantation for primary biliary cirrhosis: indications and risk of recurrence." J Hepatol. **39**(2): 142-8.
- Noll, S., Schaub-Kuhnen, S. und Höfler, H. (2000). Praxis der Immunhistochemie. München [u.a.], Urban & Fischer.
- Nomura, H., Kashiwagi, S., Hayashi, J., Kajiyama, W., Tani, S. und Goto, M. (1988). "Prevalence of fatty liver in a general population of Okinawa, Japan." Jpn J Med. **27**(2): 142-9.
- Norris, S., Collins, C., Doherty, D. G., Smith, F., McEntee, G., Traynor, O., Nolan, N., Hegarty, J. und O'Farrelly, C. (1998). "Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes." J Hepatol **28**(1): 84-90.
- Nouri-Aria, K. T., Hegarty, J. E., Alexander, G. J. M., Eddleston, A. L. W. F. und Williams, R. (1982). "Effect of Corticosteroids on Suppressor-Cell Activity in Autoimmune and Viral Chronic Active Hepatitis." New England Journal of Medicine **307**(21): 1301-1304.
- O'Mahony, C. A. und Vierling, J. M. (2006). "Etiopathogenesis of primary sclerosing cholangitis." Semin Liver Dis. **26**(1): 3-21.
- Oh, K., Kim, S., Park, S.-H., Gu, H., Roopenian, D., Chung, D. H., Kim, Y. S. und Lee, D.-S. (2005). "Direct Regulatory Role of NKT Cells in Allogeneic Graft Survival Is Dependent on the Quantitative Strength of Antigenicity." The Journal of Immunology **174**(4): 2030-2036.
- Olsson, R., Boberg, K. M., Schaffalitsky de Muckadell, O., Lindgren, S., Hultcrantz, R., Folvik, G., Bell, H., Gangsøy-Kristiansen, M., Matre, J., Rydning, A., Wikman, O., Danielsson, Å., Sandberg-Gertzén, H., Ung, K.-A., Eriksson, A., Löf, L., Prytz, H., Marschall, H.-U. und

- Broomé, U. (2005). "High-Dose Ursodeoxycholic Acid in Primary Sclerosing Cholangitis: A 5-Year Multicenter, Randomized, Controlled Study." Gastroenterology **129**(5): 1464-1472.
- Ong, J., Younossi, Z. M., Reddy, V., Price, L. L., Gramlich, T., Mayes, J. und Boparai, N. (2001). "Cryptogenic cirrhosis and posttransplantation nonalcoholic fatty liver disease." Liver Transplantation **7**(9): 797-801.
- Oo, Y., Hubscher, S. und Adams, D. (2010a). "Autoimmune hepatitis: new paradigms in the pathogenesis, diagnosis, and management." Hepatology International **4**(2): 475-493.
- Oo, Y. H., Weston, C. J., Lalor, P. F., Curbishley, S. M., Withers, D. R., Reynolds, G. M., Shetty, S., Harki, J., Shaw, J. C., Eksteen, B., Hubscher, S. G., Walker, L. S. K. und Adams, D. H. (2010b). "Distinct Roles for CCR4 and CXCR3 in the Recruitment and Positioning of Regulatory T Cells in the Inflamed Human Liver." The Journal of Immunology **184**(6): 2886-2898.
- Peiseler, M., Sebode, M., Franke, B., Wortmann, F., Schwinge, D., Quaas, A., Baron, U., Olek, S., Wiegand, C., Lohse, A. W., Weiler-Normann, C., Schramm, C. und Herkel, J. (2012). "FOXP3+ regulatory T cells in autoimmune hepatitis are fully functional and not reduced in frequency." Journal of Hepatology(Epub ahead of print).
- Peng, Y., Laouar, Y., Li, M. O., Green, E. A. und Flavell, R. A. (2004). "TGF- $\beta$  regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells responsible for protection against diabetes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(13): 4572-4577.
- Poupon, R., Chazouillères, O., Balkau, B. und Poupon, R. E. (1999). "Clinical and biochemical expression of the histopathological lesions of primary biliary cirrhosis." Journal of Hepatology **30**(3): 408-412.
- Presser, K., Schwinge, D., Wegmann, M., Huber, S., Schmitt, S., Quaas, A., Maxeiner, J. H., Finotto, S., Lohse, A. W., Blessing, M. und Schramm, C. (2008). "Coexpression of TGF- $\beta$  and IL-10 Enables Regulatory T Cells to Completely Suppress Airway Hyperreactivity." J Immunol **181**(11): 7751-7758.
- Pschyrembel, W. und Dornblüth, O. (2007). Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. Berlin [u.a.], de Gruyter.
- Racanelli, V., Barbara Rehermann, (2006). "The liver as an immunological organ." Hepatology **43**(S1): S54-S62.
- Ramage, J. K., Donaghy, A., Farrant, J. M., Iorns, R. und Williams, R. (1995). "Serum tumor markers for the diagnosis of cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis." Gastroenterology **108**(3): 865-869.
- Rasch, B. (2008a). Quantitative Methoden / Einführung in die Statistik ; Bd. 1. Heidelberg, Springer.
- Rasch, B. (2008b). Quantitative Methoden / Einführung in die Statistik ; Bd. 2. Heidelberg, Springer.
- Ratziu, V., Bonyhay, L., Di Martino, V., Charlotte, F., Cavallaro, L., Sayegh-Tainturier, M.-H., Giral, P., Grimaldi, A., Opolon, P. und Poynard, T. (2002). "Survival, liver failure, and hepatocellular carcinoma in obesity-related cryptogenic cirrhosis." Hepatology **35**(6): 1485-1493.
- Ratziu, V., Giral, P., Jacqueminet, S., Charlotte, F., Hartemann-Heurtier, A., Serfaty, L., Podevin, P., Lacorte, J.-M., Bernhardt, C., Bruckert, E., Grimaldi, A. und Poynard, T. (2008). "Rosiglitazone for Nonalcoholic Steatohepatitis: One-Year Results of the Randomized Placebo-Controlled Fatty Liver Improvement With Rosiglitazone Therapy (FLIRT) Trial." Gastroenterology **135**(1): 100-110.
- Reich, D. J., Fiel, I., Guarrera, J. V., Emre, S., Guy, S. R., Schwartz, M. E., Miller, C. M. und Sheiner, P. A. (2000). Liver transplantation for autoimmune hepatitis, W.B. Saunders. **32**: 693-700.

- Riemann, J. F. und Adam, B. (2008). Leber, Galle, Pankreas. Stuttgart [u.a.], Thieme.
- Roland, C. R., Mangino, M. J., Duffy, B. F. und Flye, M. W. (1993). "Lymphocyte suppression by Kupffer cells prevents portal venous tolerance induction: a study of macrophage function after intravenous gadolinium." Transplantation **55**(5): 1151-8.
- Roncador, G., Brown, P. J., Maestre, L., Hue, S., Martínez-Torrecuadrada, J. L., Ling, K.-L., Pratap, S., Toms, C., Fox, B. C., Cerundolo, V., Powrie, F. und Banham, A. H. (2005). "Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level." European Journal of Immunology **35**(6): 1681-1691.
- Roncarolo, M.-G. und Levings, M. K. (2000). "The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity." Current Opinion in Immunology **12**(6): 676-683.
- Sakaguchi, S., Fukuma, K., Kuribayashi, K. und Masuda, T. (1985). "Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease." J Exp Med **161**(1): 72-87.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. und Toda, M. (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." J Immunol **155**(3): 1151-1164.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakihama, T., Itoh, M., Kuniyasu, Y., Nomura, T., Toda, M. und Takahashi, T. (2001). "Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance." Immunological Reviews **182**(1): 18-32.
- Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T. und Nomura, T. (2006). "Foxp3+CD25+CD4+natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease." Immunological Reviews **212**(1): 8-27.
- Sakaguchi, S., Wing, K. und Miyara, M. (2007). "Regulatory T cells – a brief history and perspective." European Journal of Immunology **37**(S1): S116-S123.
- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M. und Hafler, D. A. (2010). "FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system." Nat Rev Immunol **10**(7): 490-500.
- Sakaki, M., Hiroishi, K., Baba, T., Ito, T., Hirayama, Y., Saito, K., Tonoike, T., Kushima, M. und Imawari, M. (2008). "Intrahepatic status of regulatory T cells in autoimmune liver diseases and chronic viral hepatitis." Hepatology Research **38**(4): 354-361.
- Sanchez-Urdazpal, L., Czaja, A. J., van Hoek, B., Krom, R. A. und Wiesner, R. H. (1992). "Prognostic features and role of liver transplantation in severe corticosteroid-treated autoimmune chronic active hepatitis." Hepatology **15**(2): 215-21.
- Sanyal, A. J., Chalasani, N., Kowdley, K. V., McCullough, A., Diehl, A. M., Bass, N. M., Neuschwander-Tetri, B. A., Lavine, J. E., Tonascia, J., Unalp, A., Van Natta, M., Clark, J., Brunt, E. M., Kleiner, D. E., Hoofnagle, J. H. und Robuck, P. R. (2010). "Pioglitazone, Vitamin E, or Placebo for Nonalcoholic Steatohepatitis." New England Journal of Medicine **362**(18): 1675-1685.
- Sarween, N., Chodos, A., Raykundalia, C., Khan, M., Abbas, A. K. und Walker, L. S. K. (2004). "CD4+CD25+ Cells Controlling a Pathogenic CD4 Response Inhibit Cytokine Differentiation, CXCR-3 Expression, and Tissue Invasion." The Journal of Immunology **173**(5): 2942-2951.
- Sasaki, M., Ikeda, H., Sawada, S., Sato, Y. und Nakanuma, Y. (2007). "Naturally-occurring regulatory T cells are increased in inflamed portal tracts with cholangiopathy in primary biliary cirrhosis." J Clin Pathol **60**(10): 1102-1107.
- Sato, K., Ohtsuka, K., Hasegawa, K., Yamagiwa, S., Watanabe, H., Asakura, H. und Abo, T. (1995). "Evidence for extrathymic generation of intermediate T cell receptor cells in the liver re-

- vealed in thymectomized, irradiated mice subjected to bone marrow transplantation." The Journal of Experimental Medicine **182**(3): 759-767.
- Scheuer, P. J. (1967). "Primary biliary cirrhosis." Proc R Soc Med. **60**.
- Scholz, C., Patton, K. T., Anderson, D. E., Freeman, G. J. und Hafler, D. A. (1998). "Expansion of Autoreactive T Cells in Multiple Sclerosis Is Independent of Exogenous B7 Costimulation." The Journal of Immunology **160**(3): 1532-1538.
- Schorle, H., Holtschke, T., Hunig, T., Schimpl, A. und Horak, I. (1991). "Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting." Nature **352**(6336): 621-624.
- Schramm, C., Kanzler, S., Meyer zum Buschenfelde, K.-H., Galle, P. R. und Lohse, A. W. (2001). "Autoimmune hepatitis in the elderly." Am J Gastroenterol **96**(5): 1587-1591.
- Schramm, C., Huber, S., Protschka, M., Czochra, P., Burg, J., Schmitt, E., Lohse, A. W., Galle, P. R. und Blessing, M. (2004). "TGF- $\beta$  regulates the CD4+CD25+ T-cell pool and the expression of Foxp3 in vivo." International Immunology **16**(9): 1241-1249.
- Schramm, C. und Galle, P. R. (2005). "Die primär sklerosierende Cholangitis als Präkanzerose." Z Gastroenterol **42**(06): 607,611.
- Schramm, C. und Lohse, A. (2005). "Overlap syndromes of cholestatic liver diseases and autoimmune hepatitis." Clinical Reviews in Allergy and Immunology **28**(2): 105-114.
- Schramm, C., Bubenheim, M., Adam, R., Karam, V., Buckels, J., O'Grady, J. G., Jamieson, N., Pollard, S., Neuhaus, P., Manns, M. M., Porte, R., Castaing, D., Paul, A., Traynor, O., Garden, J., Friman, S., Ericzon, B.-G., Fischer, L., Vitko, S., Krawczyk, M., Metselaar, H. J., Foss, A., Kilic, M., Rolles, K., Burra, P., Rogiers, X. und Lohse, A. W. (2010). "Primary liver transplantation for autoimmune hepatitis: A comparative analysis of the European Liver Transplant Registry." Liver Transplantation **16**(4): 461-469.
- Selmi, C. und Gershwin, M. E. (2004). "Bacteria and human autoimmunity: the case of primary biliary cirrhosis." Curr Opin Rheumatol. **16**(4): 406-10.
- Selmi, C., Mayo, M. J., Bach, N., Ishibashi, H., Invernizzi, P., Gish, R. G., Gordon, S. C., Wright, H. I., Zweiban, B., Podda, M. und Gershwin, M. E. (2004). "Primary biliary cirrhosis in monozygotic and dizygotic twins: Genetics, epigenetics, and environment." Gastroenterology **127**(2): 485-492.
- Serra, P., Amrani, A., Yamanouchi, J., Han, B., Thiessen, S., Utsugi, T., Verdaguer, J. und Santamaria, P. (2003). "CD40 Ligation Releases Immature Dendritic Cells from the Control of Regulatory CD4+CD25+ T Cells." Immunity **19**(6): 877-889.
- Shevach, E. M. (2002). "CD4+CD25+ suppressor T cells: more questions than answers." Nat Rev Immunol **2**(6): 389-400.
- Shevach, E. M. (2009). "Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression." Immunity **30**(5): 636-645.
- Smith, T. R. F. und Kumar, V. (2008). "Revival of CD8+ Treg-mediated suppression." Trends in Immunology **29**(7): 337-342.
- Söderberg, C., Marmur, J., Eckes, K., Glaumann, H., SÄLLberg, M., Frelin, L., Rosenberg, P., StÅL, P. E. R. und Hultcrantz, R. (2011). "Microvesicular fat, inter cellular adhesion molecule-1 and regulatory T-lymphocytes are of importance for the inflammatory process in livers with non-alcoholic steatohepatitis." APMIS **119**(7): 412-420.
- Stahel, W. A. (2008). Statistische Datenanalyse. Eine Einführung für Naturwissenschaftler. Wiesbaden, Vieweg.
- Stephens, L. A., Malpass, K. H. und Anderton, S. M. (2009). "Curing CNS autoimmune disease with myelin-reactive Foxp3+ Treg." European Journal of Immunology **39**(4): 1108-1117.

- Suri-Payer, E., Amar, A. Z., Thornton, A. M. und Shevach, E. M. (1998). "CD4+CD25+ T Cells Inhibit Both the Induction and Effector Function of Autoreactive T Cells and Represent a Unique Lineage of Immunoregulatory Cells." The Journal of Immunology **160**(3): 1212-1218.
- Swain, M. G. (2008). "Hepatic NKT cells: friend or foe?" Clinical Science **114**(7): 457-466.
- Swain, M. G. (2010). "Natural Killer T Cells within the Liver: Conductors of the Hepatic Immune Orchestra." Digestive Diseases **28**(1): 7-13.
- Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J. und Sakaguchi, S. (1998). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state." International Immunology **10**(12): 1969-1980.
- Tang, Q., Boden, E. K., Henriksen, K. J., Bour-Jordan, H., Bi, M. und Bluestone, J. A. (2004). "Distinct roles of CTLA-4 and TGF- $\beta$  in CD4+CD25+ regulatory T-cell function." European Journal of Immunology **34**(11): 2996-3005.
- Teli, M. R., James, O. F., Burt, A. D., Bennett, M. K. und Day, C. P. (1995). "The natural history of nonalcoholic fatty liver: a follow-up study." Hepatology **22**(6): 1714-9.
- Thornton, A. M. und Shevach, E. M. (1998). "CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation In Vitro by Inhibiting Interleukin 2 Production." The Journal of Experimental Medicine **188**(2): 287-296.
- Tiegs, G. und Lohse, A. W. (2009). "Immune tolerance: What is unique about the liver." Journal of Autoimmunity **34**(1): 1-6.
- Tischendorf, J. J. W., Geier, A. und Trautwein, C. (2008). Current diagnosis and management of primary sclerosing cholangitis, Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company. **14**: 735-746.
- Torbenson, M., Wang, J., Abraham, S., Maitra, A. und Boitnott, J. (2003). "Bile ducts and ductules are positive for CD56 (N-CAM) in most cases of extrahepatic biliary atresia." Am J Surg Pathol **27**(11): 1454-7.
- Trzonkowski, P., Bieniaszewska, M., Juscinska, J., Dobyszyk, A., Krzystyniak, A., Marek, N., Mysliwska, J. und Hellmann, A. (2009). "First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127- T regulatory cells." Clinical Immunology **133**(1): 22-26.
- Uhlig, H. H., Coombes, J., Mottet, C., Izcue, A., Thompson, C., Fanger, A., Tannapfel, A., Fontenot, J. D., Ramsdell, F. und Powrie, F. (2006). "Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-Secreting CD4+CD25+ T Cells during Cure of Colitis." The Journal of Immunology **177**(9): 5852-5860.
- Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H. L. und Hafler, D. A. (2004). "Loss of Functional Suppression by CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Patients with Multiple Sclerosis." The Journal of Experimental Medicine **199**(7): 971-979.
- Vignali, D. A. A., Collison, L. W. und Workman, C. J. (2008). "How regulatory T cells work." Nat Rev Immunol **8**(7): 523-532.
- Walker, R. M., Kaspruwicz, D. J., Gersuk, V. H., BÃnard, A. I., Van Landeghen, M., Buckner, J. H. und Ziegler, S. F. (2003). "Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25high T cells." The Journal of Clinical Investigation **112**(9): 1437-1443.
- Wang, D., Zhang, H., Liang, J., Gu, Z., Zhou, Q., Fan, X., Hou, Y. und Sun, L. (2010). "CD4+CD25+ but not CD4+Foxp3+ T cells as a regulatory subset in primary biliary cirrhosis." Cell Mol Immunol **7**(6): 485-490.
- Ward, S. M., Fox, B. C., Brown, P. J., Worthington, J., Fox, S. B., Chapman, R. W., Fleming, K. A., Banham, A. H. und Klenerman, P. (2007). "Quantification and localisation of FOXP3+ T

- lymphocytes and relation to hepatic inflammation during chronic HCV infection." Journal of Hepatology **47**(3): 316-324.
- Watt, F. E., James, O. F. W. und Jones, D. E. J. (2004). "Patterns of autoimmunity in primary biliary cirrhosis patients and their families: a population-based cohort study." QJM **97**(7): 397-406.
- Weismüller, T. J., Wedemeyer, J., Kubicka, S., Strassburg, C. P. und Manns, M. P. (2008). "The challenges in primary sclerosing cholangitis - Aetiopathogenesis, autoimmunity, management and malignancy." Journal of Hepatology **48**(Supplement 1): S38-S57.
- Weismüller, T. J., Fikatas, P., Schmidt, J., Barreiros, A. P., Otto, G., Beckebaum, S., Paul, A., Scherer, M. N., Schmidt, H. H., Schlitt, H. J., Neuhaus, P., Klempnauer, J., Pratschke, J., Manns, M. P. und Strassburg, C. P. (2011). "Multicentric evaluation of model for end-stage liver disease-based allocation and survival after liver transplantation in Germany – limitations of the 'sickest first'-concept." Transplant International **24**(1): 91-99.
- Wiegard, C., Frenzel, C., Herkel, J., Kallen, K.-J., Schmitt, E. und Lohse, A. W. (2005). "Murine liver antigen presenting cells control suppressor activity of CD4+CD25+ regulatory T cells." Hepatology **42**(1): 193-199.
- Wiegard, C., Wolint, P., Frenzel, C., Cheruti, U., Schmitt, E., Oxenius, A., Lohse, A. W. und Herkel, J. (2007). "Defective T Helper Response of Hepatocyte-Stimulated CD4 T Cells Impairs Antiviral CD8 Response and Viral Clearance." Gastroenterology **133**(6): 2010-2018.
- Williams, C. D., Stengel, J., Asike, M. I., Torres, D. M., Shaw, J., Contreras, M., Landt, C. L. und Harrison, S. A. (2011). "Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis Among a Largely Middle-Aged Population Utilizing Ultrasound and Liver Biopsy: A Prospective Study." Gastroenterology **140**(1): 124-131.
- Xu, D., Fu, J., Jin, L., Zhang, H., Zhou, C., Zou, Z., Zhao, J.-M., Zhang, B., Shi, M., Ding, X., Tang, Z., Fu, Y.-X. und Wang, F.-S. (2006). "Circulating and Liver Resident CD4+CD25+ Regulatory T Cells Actively Influence the Antiviral Immune Response and Disease Progression in Patients with Hepatitis B." The Journal of Immunology **177**(1): 739-747.
- Xystrakis, E., Dejean, A. S., Bernard, I., Druet, P., Liblau, R., Gonzalez-Dunia, D. und Saoudi, A. (2004). "Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation." Blood **104**(10): 3294-3301.
- Yang, X. H., Yamagiwa, S., Ichida, T., Matsuda, Y., Sugahara, S., Watanabe, H., Sato, Y., Abo, T., Horwitz, D. A. und Aoyagi, Y. (2006). "Increase of CD4+ CD25+ regulatory T-cells in the liver of patients with hepatocellular carcinoma." Journal of Hepatology **45**(2): 254-262.
- Zenewicz, L. A., Yancopoulos, G. D., Valenzuela, D. M., Murphy, A. J., Karow, M. und Flavell, R. A. (2007). "Interleukin-22 but Not Interleukin-17 Provides Protection to Hepatocytes during Acute Liver Inflammation." Immunity **27**(4): 647-659.
- Zheng, S. G., Wang, J. H., Stohl, W., Kim, K. S., Gray, J. D. und Horwitz, D. A. (2006). "TGF- $\beta$  Requires CTLA-4 Early after T Cell Activation to Induce FoxP3 and Generate Adaptive CD4+CD25+ Regulatory Cells." The Journal of Immunology **176**(6): 3321-3329.
- Zhou, L., Lopes, J. E., Chong, M. M. W., Ivanov, I. I., Min, R., Victora, G. D., Shen, Y., Du, J., Rubtsov, Y. P., Rudensky, A. Y., Ziegler, S. F. und Littman, D. R. (2008). "TGF- $\beta$ -induced Foxp3 inhibits TH17 cell differentiation by antagonizing ROR $\gamma$ t function." Nature **453**(7192): 236-240.
- Zierden, M., Kühnen, E., Odenthal, M. und Dienes, H. P. (2009). "Impact and regulation of auto-reactive CD8+ T Cells in a transgenic mouse model of autoimmune hepatitis." Journal of Hepatology **50**(Supplement 1): S253-S253.
- Zola, H. (2007). Leukocyte and stromal cell molecules. The CD markers. Hoboken, N.J., Wiley.

Tabelle 20: Anhang - Klinik

ID	Geschlecht	Alter	Jahr der Biopsie	Chronisch entzündliche Darmerkrankung	weitere Diagnosen autoimmuner Genese	Medikamentöse Therapie
NASH-1	m	30	2007	-	Autimmunthyeroditis	-
NASH-2	m	42	2006	-	-	<i>unbek.</i>
NASH-3	w	55	2006	-	-	-
NASH-4	m	17	2007	-	-	-
NASH-5	w	61	2007	-	-	-
NASH-6	w	45	2006	-	Autimmunthyeroditis	-
NASH-7	w	49	2006	-	-	-
NASH-8	w	20	2004	<i>unbek.</i>	<i>unbek.</i>	<i>unbek.</i>
PSC-1	w	60	2007	-	-	-
PSC-2	w	21	2007	Colitis Ulcerosa	-	Ursodesoxycholsäure
PSC-3	m	47	2006	-	M. Bechterew	-
PSC-4	m	46	2007	-	-	-
PSC-5	m	22	2007	-	-	-
PSC-6	m	36	2006	-	-	-
PSC-7	m	28	2006	-	-	Ursodesoxycholsäure, Steroide
PBC-1	w	52	2008	-	-	Ursodesoxycholsäure
PBC-2	w	61	2007	-	-	-
PBC-3	m	63	2007	-	systemischen Lupus erythematodes	Ursodesoxycholsäure
PBC-4	w	44	2007	-	-	-
PBC-5	w	46	2006	-	-	Ursodesoxycholsäure
PBC-6	w	52	2007	-	-	-
PBC-7	w	64	2008	-	-	-
PBC-8	w	46	2008	-	<i>unbek.</i>	-
PBC-9	w	70	2008	-	<i>unbek.</i>	-
PBC-10	w	66	2007	-	-	-
PBC-11	w	51	2008	-	-	Ursodesoxycholsäure
PBC-12	w	59	2008	-	-	-
PBC-13	w	57	2008	-	CREST Syndrom	-
AIH-1	w	25	2005	-	-	-
AIH-2	w	55	2005	-	-	-
AIH-3	w	38	2006	-	Autimmunthyeroditis	-
AIH-4	w	48	2005	-	Autimmunthyeroditis	-
AIH-5	w	59	2007	-	-	-
AIH-6	w	66	2008	-	-	-
AIH-7	w	53	2007	-	-	-
AIH-8	m	30	2007	-	-	-
AIH-9	w	62	2008	-	-	Steroide
AIH-10	w	63	2008	-	-	-
AIH-11	w	22	2008	-	-	Steroide, Mycophenolatmofetil
AIH-12	m	70	2008	-	-	-

Tabelle 21: Anhang - Labor

ID	Geschlecht	Alter	mHAI (0-18)	GOT (U/l)	GPT (U/l)	Bilirubin (mg/dl)	Albumin (g/l)	Alkalische Phosphatase (U/l)	IgG (g/l)	G-Globuline (%)	IgM (g/l)	bekannte Antikörpererhöhungen
NASH-1	m	30	2	35	<b>66</b>	<b>1,6</b>	46	44	11,05	15,4	0,91	-
NASH-2	m	42	2	45	<b>80</b>	0,7	41	66	-	-	-	-
NASH-3	w	55	3	28	<b>52</b>	0,2	-	81	7,68	-	0,55	-
NASH-4	m	17	2	<b>52</b>	<b>102</b>	<b>1,4</b>	49	101	15,89	<b>21,3</b>	1,54	ANA
NASH-5	w	61	3	<b>54</b>	30	0,7	43	107	<b>17,05</b>	<b>22,8</b>	0,64	-
NASH-6	w	45	4	44	<b>73</b>	0,9	37	92	8,54	14,6	1,52	-
NASH-7	w	49	4	<b>59</b>	50	-	-	75	-	-	-	-
NASH-8	w	20	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PSC-1	w	60	3	45	<b>80</b>	0,6	46	77	8,93	15,6	-	-
PSC-2	w	21	3	37	38	0,5	45	83	10,92	16,7	2,01	-
PSC-3	m	47	4	46	<b>67</b>	<b>11</b>	40	<b>437</b>	7,06	-	0,56	-
PSC-4	m	46	2	<b>85</b>	<b>123</b>	<b>2</b>	46	67	13,49	<b>19,6</b>	0,74	ANA
PSC-5	m	22	3	48	<b>81</b>	0,4	48	<b>176</b>	11,33	14,1	0,74	-
PSC-6	m	36	2	<b>110</b>	<b>190</b>	0,6	46	<b>430</b>	10,78	-	1,53	-
PSC-7	m	28	6	<b>261</b>	<b>651</b>	0,7	43	<b>325</b>	<b>24,65</b>	<b>25,41</b>	0,9	ANA, SMA
PBC-1	w	52	2	29	38	0,6	49	57	12,34	16,7	2,12	ANA, AMA, M2
PBC-2	w	61	4	47	<b>56</b>	0,5	45	122	13,98	18,6	1,84	AMA, M2
PBC-3	m	63	2	23	19	0,3	46	68	13,2	18,2	1,07	AMA, M2
PBC-4	w	44	4	<b>55</b>	48	0,2	45	<b>138</b>	<b>16,03</b>	<b>22,1</b>	1,92	ANA, AMA, M2
PBC-5	w	46	5	25	36	0,6	40	104	12,89	<b>20,5</b>	<b>4,84</b>	AMA
PBC-6	w	52	5	<b>74</b>	<b>93</b>	0,4	44	<b>622</b>	<b>28,43</b>	<b>31,2</b>	2,21	AMA, M2, SMA
PBC-7	w	64	4	35	43	<b>1,1</b>	48	<b>146</b>	10,4	16,7	<b>3,5</b>	AMA, M2
PBC-8	w	46	6	49	49	0,5	46	102	11,27	17,4	2,03	AMA, M2
PBC-9	w	70	6	<b>65</b>	41	0,7	43	73	13,33	<b>19,3</b>	1,94	ANA, AMA, M2
PBC-10	w	66	8	<b>64</b>	<b>90</b>	0,8	41	<b>740</b>	13,77	<b>21</b>	<b>4,76</b>	AMA, M2
PBC-11	w	51	6	24	15	<b>1,1</b>	44	<b>168</b>	14,27	17,19	1,97	AMA
PBC-12	w	59	2	24	21	0,4	46	126	9,5	15,6	<b>3,25</b>	ANA, AMA
PBC-13	w	57	4	33	23	0,7	44	52	13,12	<b>20,4</b>	2,21	-
AIH-1	w	25	12	<b>845</b>	<b>1979</b>	<b>9,3</b>	39	89	<b>18,37</b>	<b>22,6</b>	0,51	SMA
AIH-2	w	55	8	49	<b>80</b>	0,5	44	123	15,38	<b>21,9</b>	<b>4,02</b>	ANA
AIH-3	w	38	5	47	<b>104</b>	0,5	44	74	<b>17,75</b>	1,19	1,19	SMA
AIH-4	w	48	5	<b>447</b>	<b>1181</b>	0,4	42	<b>137</b>	13,83	<b>19,4</b>	0,83	-
AIH-5	w	59	9	<b>587</b>	<b>923</b>	<b>8,6</b>	41	<b>200</b>	<b>24,41</b>	<b>30,9</b>	1,37	SMA
AIH-6	w	66	7	<b>66</b>	<b>146</b>	0,5	46	62	14,12	<b>19,6</b>	0,49	ANA, LKM
AIH-7	w	53	10	<b>60</b>	<b>70</b>	0,6	48	81	<b>16,68</b>	<b>22,6</b>	<b>2,56</b>	ANA
AIH-8	m	30	8	<b>172</b>	<b>443</b>	<b>1,5</b>	49	71	11,81	17,4	1,19	-
AIH-9	w	62	9	<b>348</b>	<b>619</b>	0,8	44	116	<b>20,21</b>	<b>25,9</b>	1,12	ANA, SLA, SMA
AIH-10	w	63	6	39	32	0,3	42	<b>236</b>	14,16	<b>20,1</b>	1,52	ANA, SMA
AIH-11	w	22	8	<b>81</b>	<b>93</b>	<b>2,2</b>	37	<b>366</b>	<b>36,81</b>	<b>38,8</b>	0,52	ANA
AIH-12	m	70	7	50	<b>79</b>	0,7	45	<b>213</b>	<b>20,04</b>	<b>26,2</b>	0,76	ANA, SMA

fett: Außerhalb des laborspezifischen Normalwerts

Tabelle 22: Anhang - mHAI (detailliert)

<b>Ergebnisse des mHAI Scorings</b>					
	A: periportale Hepatitis 0-4	B: Gruppen- nekrosen 0-6	C: Einzelzell- nekrosen 0-4	D: portale Entzündung 0-4	Gesamt Score 0-18
NASH-1	0	0	1	1	2
NASH-2	0	0	1	1	2
NASH-3	0	0	1	2	3
NASH-4	0	0	1	1	2
NASH-5	0	0	1	2	3
NASH-6	1	0	1	2	4
NASH-7	0	0	2	2	4
NASH-8	0	0	1	1	2
AIH-1	3	1	4	4	12
AIH-2	2	0	3	3	8
AIH-3	1	0	2	2	5
AIH-4	1	0	2	2	5
AIH-5	2	1	3	3	9
AIH-6	2	0	2	3	7
AIH-7	3	1	3	3	10
AIH-8	3	0	2	3	8
AIH-9	2	1	3	3	9
AIH-10	1	0	2	3	6
AIH-11	2	0	3	3	8
AIH-12	2	0	2	3	7
PSC-1	0	0	1	2	3
PSC-2	0	0	1	2	3
PSC-3	1	0	1	2	4
PSC-4	0	0	1	1	2
PSC-5	0	0	1	2	3
PSC-6	0	0	1	1	2
PSC-7	1	0	2	3	6
PBC-1	0	0	1	1	2
PBC-2	1	0	1	2	4
PBC-3	0	0	1	1	2
PBC-4	1	0	1	2	4
PBC-5	1	0	2	2	5
PBC-6	1	0	2	2	5
PBC-7	1	0	1	2	4
PBC-8	1	0	2	3	6
PBC-9	1	0	2	3	6
PBC-10	2	0	3	3	8
PBC-11	1	0	2	3	6
PBC-12	0	0	1	1	2
PBC-13	0	0	1	3	4

Tabelle 23: Anhang - Zellzahlen, portal (detailliert)

ID	Geschlecht	Alter	Cd3, portal	Cd4, portal	Cd8, portal	Foxp3, portal	Cd20, portal	Cd163, portal	MPO, portal
NASH-1	m	30	533,05	975,42	540,66	-	397,31	484,05	0,00
NASH-2	m	42	1779,77	478,09	1203,29	58,30	210,00	657,20	34,52
NASH-3	w	55	1501,51	724,03	811,05	19,39	519,37	611,87	6,45
NASH-4	m	17	1043,29	387,99	1078,89	35,05	349,90	1044,97	117,78
NASH-5	w	61	1729,43	1896,66	1464,96	178,97	272,10	-	208,95
NASH-6	w	45	2060,14	881,69	-	77,94	374,27	1118,00	37,06
NASH-7	w	49	1918,54	1142,61	597,30	-	185,36	236,45	12,94
NASH-8	w	20	1090,41	-	700,56	-	408,21	1534,96	138,76
PSC-1	w	60	1583,60	-	1635,16	13,39	31,19	719,80	14,07
PSC-2	w	21	1885,14	612,76	488,55	33,52	38,58	198,89	0,00
PSC-3	m	47	2810,89	574,93	1331,34	69,06	187,44	701,52	44,01
PSC-4	m	46	568,96	477,24	259,16	19,30	29,16	115,94	0,00
PSC-5	m	22	1301,83	692,52	860,29	44,48	154,11	330,19	330,76
PSC-6	m	36	1851,87	-	1005,76	36,28	37,29	269,10	40,80
PSC-7	m	28	1772,28	819,00	1091,78	180,10	347,55	556,28	109,61
PSC-8	w	35	2649,09	889,82	1300,49	79,66	216,81	1214,07	1411,37
PSC-9	m	21	2116,92	1379,94	448,38	322,34	146,41	182,21	6,03
PSC-10	m	43	2514,05	541,31	1025,34	178,56	256,17	1263,87	273,10
PBC-1	w	52	2556,48	460,03	1198,36	16,82	186,45	451,18	145,30
PBC-2	w	61	1913,76	709,76	1122,72	249,05	464,52	1434,15	0,00
PBC-3	m	63	1107,41	-	369,27	66,57	0,00	275,06	22,15
PBC-4	w	44	2050,13	496,30	1541,93	278,99	246,58	1253,05	0,00
PBC-5	w	46	4081,41	820,63	1230,87	135,05	1857,43	2532,48	173,10
PBC-6	w	52	4213,50	800,38	1352,89	144,38	193,91	1110,29	74,76
PBC-7	w	64	3368,77	1890,39	1672,43	79,18	1001,08	892,83	88,41
PBC-8	w	46	5804,56	2562,62	3547,19	566,76	986,78	1301,49	235,97
PBC-9	w	70	3951,53	1961,01	2191,94	219,19	662,61	1178,99	26,73
PBC-10	w	66	5765,37	2638,08	1674,76	799,79	786,70	889,47	131,73
PBC-11	w	51	3753,64	2339,39	1495,87	387,54	1907,63	570,03	14,21
PBC-12	w	59	1440,49	664,78	825,09	57,57	20,24	462,64	30,75
PBC-13	w	57	3685,17	3094,38	2794,83	417,30	2541,29	1144,31	89,05
PBC-14	w	56	1992,90	-	1087,22	173,73	272,88	709,60	37,52
PBC-15	w	55	4164,06	2806,75	2558,46	396,02	810,65	1752,44	122,19
AIH-1	w	25	3041,17	-	2275,89	12,20	1901,04	1827,42	31,81
AIH-2	w	55	2741,35	1103,81	1710,92	314,70	1367,91	2468,44	108,98
AIH-3	w	38	2434,74	-	1833,89	358,58	1684,94	2160,61	199,39
AIH-4	w	48	1488,11	-	551,72	-	830,72	1119,99	17,80
AIH-5	w	59	2241,29	1076,28	1446,32	303,07	1654,14	1006,05	319,84
AIH-6	w	66	5230,34	5032,63	2720,79	415,35	3327,83	1455,90	151,28
AIH-7	w	53	3937,98	2922,94	2054,74	424,34	4203,44	1295,77	17,76
AIH-8	m	30	2786,88	1082,86	2371,70	565,11	1050,33	1680,05	362,68
AIH-9	w	62	4905,22	3488,05	1856,20	506,77	1587,24	2187,10	56,75
AIH-10	w	63	3140,82	1852,66	2910,15	352,59	1060,38	1126,63	226,02
AIH-11	w	22	1778,00	1124,14	1084,13	388,22	106,13	1160,92	319,59
AIH-12	m	70	3550,97	2901,18	1121,72	475,76	2339,24	1578,31	285,82

Tabelle 24: Anhang - Zellzahl, lobulär (detailliert)

ID	Geschlecht	Alter	Cd3, lobulär	Cd4, lobulär	Cd8, lobulär	Foxp3, lobulär	Cd20, lobulär	Cd163, lobulär	MPO, lobulär
NASH-1	m	30	74,15	n/a	37,10	-	2,43	476,09	20,50
NASH-2	m	42	183,90	n/a	130,28	4,49	0,00	308,30	13,48
NASH-3	w	55	76,37	n/a	24,71	0,00	11,23	449,22	47,17
NASH-4	m	17	71,88	n/a	83,11	4,49	15,72	399,81	69,63
NASH-5	w	61	92,57	n/a	62,95	2,76	11,23	352,03	25,45
NASH-6	w	45	105,57	n/a	-	6,74	16,13	446,98	13,48
NASH-7	w	49	98,83	n/a	53,91	-	11,23	345,90	51,66
NASH-8	w	20	62,89	n/a	22,46	-	4,49	321,20	11,23
PSC-1	w	60	276,27	n/a	233,60	0,00	8,98	655,87	15,72
PSC-2	w	21	97,47	n/a	97,21	0,00	24,76	485,16	26,95
PSC-3	m	47	194,29	n/a	189,52	6,74	7,01	908,07	4,58
PSC-4	m	46	83,11	n/a	51,66	6,97	15,72	397,56	6,85
PSC-5	m	22	69,63	n/a	26,95	2,25	13,48	503,13	56,15
PSC-6	m	36	95,20	n/a	65,19	0,00	24,71	487,52	106,15
PSC-7	m	28	106,35	n/a	280,64	2,25	24,71	704,14	40,43
PSC-8	w	35	139,26	n/a	94,34	2,25	8,98	498,64	59,36
PSC-9	m	21	227,40	n/a	90,38	10,52	55,57	505,34	8,37
PSC-10	m	43	123,54	n/a	80,86	2,25	13,48	482,92	24,71
PBC-1	w	52	260,55	n/a	203,59	4,59	35,94	930,23	45,15
PBC-2	w	61	105,57	n/a	83,11	2,25	4,53	729,99	58,40
PBC-3	m	63	114,55	n/a	31,45	8,51	17,97	381,84	24,71
PBC-4	w	44	132,52	n/a	26,95	0,00	6,74	518,85	15,72
PBC-5	w	46	225,78	n/a	123,21	2,53	20,18	643,62	56,15
PBC-6	w	52	254,49	n/a	184,45	5,65	8,27	352,62	20,92
PBC-7	w	64	181,94	n/a	128,03	8,98	13,48	772,67	47,17
PBC-8	w	46	112,31	n/a	112,31	8,98	11,23	541,32	38,18
PBC-9	w	70	339,37	n/a	205,26	11,37	8,98	846,79	24,71
PBC-10	w	66	128,03	n/a	38,18	17,97	8,98	759,19	17,97
PBC-11	w	51	175,20	n/a	74,12	8,98	13,48	902,94	60,65
PBC-12	w	59	168,66	n/a	108,12	10,61	12,37	963,59	74,37
PBC-13	w	57	278,52	n/a	231,35	6,74	13,90	714,27	65,14
PBC-14	w	56	191,11	n/a	126,74	8,76	17,21	541,60	33,93
PBC-15	w	55	256,06	n/a	190,92	11,23	6,74	918,66	47,17
AIH-1	w	25	665,65	n/a	724,77	5,08	51,99	1000,62	57,37
AIH-2	w	55	280,77	n/a	172,95	15,72	6,74	783,90	26,95
AIH-3	w	38	118,53	n/a	96,58	16,85	0,00	612,61	101,05
AIH-4	w	48	105,76	n/a	93,13	-	16,79	714,15	42,45
AIH-5	w	59	599,71	n/a	471,69	38,18	17,97	927,63	34,26
AIH-6	w	66	300,98	n/a	341,41	28,64	8,98	889,46	67,38
AIH-7	w	53	444,95	n/a	332,53	41,34	39,40	630,94	29,38
AIH-8	m	30	110,06	n/a	101,08	8,98	8,98	610,94	26,00
AIH-9	w	62	592,98	n/a	586,24	67,38	22,46	997,24	42,68
AIH-10	w	63	262,80	n/a	184,18	15,72	7,48	544,09	87,99
AIH-11	w	22	296,49	n/a	132,52	11,23	2,25	849,03	83,11
AIH-12	m	70	179,69	n/a	141,51	8,98	17,97	770,42	49,41

## Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Ansgar Lohse in dessen Klinik diese Arbeit entstanden ist. Seine didaktisch hervorragende Lehre und seine kritische Herangehensweise an wissenschaftliche Themen haben mich stets motiviert.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Christoph Schramm für das große Vertrauen und den stetigen Rat. Im Austausch mit ihm ließ sich so manche Lösung entwickeln. Sein Engagement und seine freundliche Art sorgten stets für ein angenehmes und angeregtes Arbeitsklima.

Ich danke PD Dr. Johannes Herkel für technische Ratschläge, theoretische Diskussionen und die ausgezeichnete Betreuung im Labor.

Dorothee Schwinge danke ich für inhaltliches Feedback und Hilfe bei allerlei Organisatorischem. Ebenfalls danke ich auch Antonella Carambia stellvertretend für alle Doktorandinnen und Doktoranden der I. Medizinischen Klinik für die problemlose und gewinnbringende Zusammenarbeit.

Aus dem Institut für Pathologie danke ich Dr. A. Quas für die Unterstützung beim histologischen Assessment und Prof. G. Sauter für das Bereitstellen der Gewebeproben der Patientenkollektive.

Aus dem Institut für Neurologie danke ich PD Dr. med. Tim Magnus und seiner Arbeitsgruppe für das Bereitstellen der Hardware zur lichtmikroskopischen Auswertung. Besonders K. Lardong und E. Orthey danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, aber auch für ihre Freundlichkeit und Motivation.

Für die Tipps und Tricks der Immunhistochemie danke ich besonderers Frau A. Thieke aus dem Institut für Pathologie.

Ich danke Frau Dr. C. Gräfin zu Eulenburg für die kritische Beurteilung der Statistik und rege Diskussion über das Für und Wieder der verschiedenen statistischen Methoden.

Für die technische Unterstützung und Hilfsbereitschaft im Labor der I. Medizinischen Klinik danke ich M. Hilken, M. Petersen, N. Peters und H. Reschke.

Den Mitarbeitern des Zentralarchivs und der Ambulanz der I. Med. danke ich für die Unterstützung beim Auffinden der umfangreich verteilten Patientenunterlagen zu einer Zeit vor der Digitalisierung am UKE.

Zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Familie und Freunden, insbesondere meiner Lebensgefährtin, für ihre Geduld, Entbehrenen und Motivation.

## **Lebenslauf**

*Der Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen*

## Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, 23.11.2012

Ort/Datum

B. Franke

Unterschrift