Charakterisierung immunpathogenetischer Mechanismen der Primär Sklerosierenden Cholangitis

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

im Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

> vorgelegt von Tanja Schoknecht aus Rotenburg (Wümme)

Hamburg, Juli 2014

Gutachter

1. Prof. Dr. Christoph Schramm

I. Medizinische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

2. Prof. Dr. Susanne Dobler

Zoologisches Institut an der Universität Hamburg

Tag der Disputation: 26.09.2014

Inhaltsverzeichnis

1. Eir	leitung	1
1.1.	Autoimmune Lebererkrankungen	1
1.2.	Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC)	1
1.2	2.1. Definition, Diagnostik und Therapie	1
1.2	2.2. Genetische Prädisposition	3
1.2	2.3. Pathogenetische Aspekte	4
1.3.	Primär Biliäre Zirrhose (PBC) und Autoimmune Hepatitis (AIH)	6
1.3	8.1 Primär Biliäre Zirrhose (PBC)	6
1.3	Autoimmune Hepatitis (AIH)	7
1.4.	CD4+ T-Helferzellen	9
1.4	.1. Th17-Zellen	10
1.4	.2. Regulatorische T-Zellen	12
1.5.	MAIT-Zellen	15
1.6.	Apoptose von T-Zellen	16
1.7.	Plasmazytoide Dendritische Zellen (pDCs)	19
1.8.	Zielsetzung	20
2. Ma	terial und Methoden	23
2.1	Laborgeräte	23
2.2	Verbrauchsmaterialien	24
2.3	Humanes Vollblut	24
2.4	Chemikalien und Lösungen	25
2.5	Kits	27
2.6	Referenzkeime	27
2.7	Antikörper (AK) für die Durchflusszytometrie	28
2.8	Puffer	29
2.9	Primer für die Polymerase-Kettenreaktion	29
2.10	Software	29
2.11	Zellbiologische Methoden	30
2.1	1.1 Bestimmung der Zellzahl	30
2.1	1.2 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMCs)	30

	2.11	.3 Herstellung von hitzeinaktivierten Keimen	30
	2.11	.4 Stimulierung von PBMCs mit hitzeinaktivierten Keimen	31
	2.11	.5 Stimulierung von Zellen für die Zytokinbestimmung im Zellkulturüberstand	31
	2.11	.6 Stimulierung von PBMCs für die Analyse der Oberflächenexpression regulatorisc	her
		Moleküle	31
	2.12	Immunologische Methoden	3
	0 1 0		2
	2.13		3
	2.14	Statistische Analysen	3
3	Erg	ebnisse	4
	3.1	Charakterisierung des Patientenkollektivs	4
	3 7	Untersuchung der Expression pro inflammatorischer Zuteking im perinheren l	Plut
	J.4	von DSC Dotionton	
	2.2.5	von PSC-Patienten	4
	3.2.	1 Verstarkte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine durch PBMCs von PSC- Batiantan nach Stimulation mit nathaganan Kaiman	41
	2.2	Fatienten nach Stimulation mit pathogenen Keimen	41
	3.2.	2 Ernonte 1n1/-Zeilfrequenz und 1L-1/-Sekretion im peripheren Blut von PSC- Batiantan	4.4
	2.2		44
	3.2	3 Die Frequenz IFNy-exprimierender Zeilen im peripheren Blut und die IFNy-	
		Zytokinsekretion von PBMCs liegen bei PSC-Patienten unverändert zu Gesunden	10
	2.2	Vor	40
	3.2.4	4 Verstarkte 1L-15-Sekretion im peripheren Blut von PSC-Patienten	48
	3.3	Einfluss chronischer Darmentzündungen und Keimbesiedlung der Gallengänge	e auf
		die Zytokinexpression von PBMCs bei Patienten mit PSC	5
	3.3.2	1 Verstärkte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine durch PBMCs von PSC-	
		Patienten nach Stimulation mit pathogenen Keimen ist unabhängig von CED und	
		Keimbesiedlung der Gallengänge	50
	3.3.2	2 Erhöhte Th17-Zellfrequenz und IL-17-Sekretion im peripheren Blut von PSC-	
		Patienten ist unabhängig von CED und Keimbesiedlung der Gallengänge	53
	3.4	Charakterisierung der leukozytären Zellzusammensetzung im peripheren Blut	von
		PSC-Patienten	5
	34	1 Anteile der Leukozyten- und Lymphozyten finden sich hei PSC-Patienten	0
		unverändert zu Kontrollen	56
	3.4.2	2 Frequenz der pDCs und DCs ist im peripheren Blut von PSC-Patienten im Verglei	ich
		zu Kontrollgruppen unverändert	60
	3.4.2	3 Verminderte MAIT-Zellfrequenzen im peripheren Blut von Patienten mit	
	2	autoimmuner und viraler Leberentzündung sowie chronischer Darmentzündung	62
	3.4.4	4 Verminderte MAIT-Zellfrequenz im peripheren Blut von PSC-Patienten ist	
		unabhängig von CED und Keimbesiedlung der Gallengänge	63

3	8.5	Charakterisierung regulatorischer Zellen und Moleküle im peripheren Blut von PSC-
		Patienten65
	3.5.	1 Tr1-Frequenz ist im peripheren Blut von PSC-Patienten unverändert zu
		Kontrollgruppen65
	3.5.	2 Verminderte IL10-Sekretion durch PBMCs im peripheren Blut von PSC-Patienten 66
	3.5.	3 Verminderte Frequenz GARP-exprimierender Tregs im peripheren Blut von PSC-
		Patienten67
3	8.6	Charakterisierung der Apoptosesensitivität von T-Zellen im peripheren Blut von
		PSC-Patienten 71
	3.6.	1 PSC-Patienten weisen eine verminderte Apoptoserate der CD4+ T-Zellen nach RICD
		und CWID auf71
	3.6.2	2 Verminderte Hochregulierung von Bim nach RICD in T-Zellen von PSC-Patienten 73
4	Disł	xussion76
4	.1	Untersuchung der Expression pro-inflammatorischer Zytokine im peripheren Blut
		von PSC-Patienten76
4	.2	Charakterisierung der leukozytären Zellzusammensetzung im peripheren Blut von
		PSC-Patienten 81
4	.3	Charakterisierung regulatorischer Zellen und Moleküle im peripheren Blut von PSC-
		Patienten 83
4	.4	Charakterisierung der Apoptosesensitivität von T-Zellen im peripheren Blut von
		PSC-Patienten 85
4	.5	Ausblick 89
5	Zus	ammenfassung93
6	Abs	tract95
7	Lite	raturverzeichnis97
8	Abk	ürzungsverzeichnis119
9	Pub	likationen123
10	Dan	ksagung124
11	Eide	esstattliche Versicherung126

1. Einleitung

1.1. Autoimmune Lebererkrankungen

Als autoimmune Lebererkrankungen werden die Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC), die Primär Biliäre Zirrhose (PBC) und die Autoimmune Hepatitis (AIH) bezeichnet. Allen diesen Erkrankungen ist gemein, dass das Immunsystem die Leber angreift, wobei die jeweilige Ätiologie und mögliche Umwelteinflüsse als Auslöser bislang ungeklärt sind. Obwohl jede dieser Erkrankungen ein wohl definiertes klinisches, morphologisches und serologisches Profil besitzt, treten Variationen und atypische Formen nicht selten auf. Auf Grund unzureichend wirksamer Medikation stellen die autoimmunen Lebererkrankungen eine der häufigsten Indikationen für Lebertransplantationen (fast 20%) in Europa dar¹.

1.2. Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC)

1.2.1. Definition, Diagnostik und Therapie

Die Primär Sklerosierende Cholangitis ist eine komplexe Lebererkrankung mit heterogenem Auftreten. Sie ist charakterisiert durch chronische Cholestase in Assoziation mit chronischer Entzündung des biliären Epithels was im Verlauf eine Fibrosierung des hepatischen Parenchyms und des Gallengangssystems induziert²⁻⁴. Dies führt zur chronisch entzündlichen Sklerose und Vernarbung der extra- und intrahepatischen Gallengänge⁵⁻⁸, Zirrhose und Malignität, insbesondere der Gallengänge^{2,3,5-7}.

Die Prävalenz der PSC liegt in Nordamerika und Europa bei 6-16/100.000^{9,10}, so dass von einer seltenen Erkrankung gesprochen werden kann. Obwohl PSC auch bei Kindern auftreten kann, liegt das mittlere Erkrankungsalter der PSC zwischen 30 und 40 Jahren, wobei zweimal mehr Männer betroffen sind als Frauen^{11,12}. Im Durchschnitt liegt die mittlere Lebenserwartung ohne Lebertransplantation bei 12-18 Jahren^{2,3,13}.

Die klinischen Symptome der PSC variieren sehr stark und können sowohl leberspezifisch als auch nicht spezifisch sein. Sie beinhalten Müdigkeit, abdominale Schmerzen, Ikterus, cholestatischen Juckreiz (Pruritus) und Fieber^{2,5,14}. Die PSC ist stark assoziiert mit chronisch entzündlichen Darmerkerkrankungen (CED), welche 60-80% der Patienten im Laufe der Erkrankung entwickeln und auch das Risiko an Darmkrebs zu erkranken erhöhen. Hierbei tritt vorwiegend ein Colitis Ulcerosa ähnliches Krankheitsbild auf (in ca. 75% der Fälle), deren Krankheitsaktivität nicht mit der PSC korrelieren muss^{5,7}. Die Assoziation der PSC mit CED legt nahe, dass die PSC nicht notwendigerweise eine klassische autoimmune Erkrankung ist,

bei der es zu einer gezielten adaptiven Immunantwort gegen Autoantigene im Gewebe kommt. Vielmehr scheint die CED primär durch eine abnormale Reaktion des angeborenen Immunsystems gegen Antigene der Darmflora ausgelöst zu werden, was schließlich zu einer adaptiven Immunantwort führt¹⁵.

PSC führt bei 10-15% der Patienten zur Ausbildung eines Cholangiokarzinoms¹⁶, aber auch das Risiko an Gallenblasentumoren (2%) und Leberkarzinomen zu erkranken ist erhöht¹⁷.

Patienten weisen erhöhte Serumspiegel an alkalischer Phosphatase auf, was zum Teil die einzige biochemische Veränderung des Serums darstellt². Die Entzündung bei der PSC scheint größtenteils eine Th1-basierte Immunreaktion zu sein. Hierfür spricht, dass leberinfiltrierende Lymphozyten bei der PSC erhöhte Spiegel an TNFα und IL1-β und geringe Konzentrationen an IL-2 und IL-10 im Vergleich zu Kontrollgruppen sezernieren¹⁸. Auch hohe Konzentrationen an nicht spezifischen Autoantikörpern, perinukleären Antikörpern gegen Neutrophile (p-ANCAs) und Autoantikörper gegen biliäres Epithel und Darmepithel sind in etwa 80% der Patienten zu finden^{19,20}. Die Portaltrakte von PSC-Lebern weisen Zellinfiltrationen auf, die vorwiegend aus CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten bestehen, aber auch Neutrophile, B-Zellen, natürliche Killer-T-Zellen (NKT-Zellen), natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Makrophagen und Plasmazellen enthalten und sich vorwiegend um die Gallengänge herum lokalisieren²¹.

Die Diagnose der PSC erfolgt durch Indentifizierung der fibrotischen Gallengangsveränderungen mittels Endoskopie (ERCP) oder Magnetresonanztomographie (MRCP)²². Es gibt momentan noch keine effektive medikamentöse Behandlung, die den progressiven Verlauf der PSC-Erkrankung aufhalten kann, so dass die PSC bis heute eine der häufigsten Indikationen für Lebertransplantationen darstellt^{2,5}. Die Erkrankung rezidiviert in bis zu 20% der Fälle innerhalb von 5 Jahren nach Lebertransplantation, was zu einem vorzeitigen Verlust des Transplantats führen kann²³. Der Einsatz der hydrophilen Gallensäure Ursodesoxycholsäure, welche einen positiven Effekt auf das Krankheitsbild anderer chronisch cholestatischer Lebererkrankungen wie der Primär Biliären Zirrhose zeigt, wird bei der PSC kontrovers diskutiert²⁴. Auch die Therapie mit immunsupprimierenden Glukokortikoiden hat trotz der autoimmunen Komponente der PSC-Pathogenese, im Gegensatz zum Einsatz bei anderen Autoimmunerkrankungen, keinen positiven Effekt auf das Krankheitsbild der PSC⁷.

Die Ätiologie und der pathogenetische Mechanismus der PSC sind bis heute noch nicht voll verstanden, scheinen aber multifaktoriell zu sein^{2,25}. Hierbei scheinen sowohl genetische als auch äußere Einflüsse beteiligt zu sein, welche zu einer komplexen Interaktion zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem führen, die letztlich Lymphozytenmigration, Schädigung der Cholangiozyten und progressive Fibrose auslösen²⁵. Ob die primäre

Schädigung der Gallengänge durch eine Reaktion des Immunsystems oder durch toxische Gallensäuren entsteht, ist noch nicht geklärt¹⁴.

1.2.2. Genetische Prädisposition

Eine genetische Prädisposition der PSC ist wahrscheinlich, da das Erkrankungsrisiko unter Geschwistern um das 40-100-fache erhöht ist²⁶. Genomweite Assoziationsstudien zeigten starke Assoziation der PSC mit Genen des Haupthistokompatibilitätskomplex (HLA) auf dem Chromosom 6p21, was die Annahme als Immun-vermittelte oder sogar autoimmune Erkrankung bestärkt^{27,28}. Außerhalb des HLA-Komplexes wurden bis heute 15 weitere PSC-prädisponierende Loci gefunden, die immunologische Relevanz besitzen²⁹⁻³³, z.B. der Gallensäurerezeptor TGR5^{30,34}, der Transkriptionsfaktor plasmazytoider DCs E2-2/Tcf4³⁰, der IL-2-Rezeptor, IL-2/IL-21, REL, CARD9, MST1, CD28 und das pro-apoptotische Molekül BIM^{14,27,29,35,36}. Diese PSC-assoziierten Genpolymorphismen sind nicht ausschließlich PSC-spezifisch, da sie auch bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED)¹⁴ und Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis auftreten^{5,29}.

Locus	Gene	PSC	UC	CD	DM	CeD	RA	AITD	MS	PBC	VIT	AS	PS	SLE	SSc	SARC
01p36.32	TNFRSF14	-1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
02q13	BCL2L11	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
02q33	CD28	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
02q37.3	GPR35	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
03p21.31	MSTI	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
04q27	IL2,IL21	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
06p21	HLA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
06q15	BACH2	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
10p15.1	IL2RA	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
11q23	SIK2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12q13	HDAC7	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12q24	SH2B3	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
18q21	TCF4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18q22	CD226	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19q13	PRKD2, STRN4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21q22	PSMG1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Number of shared loci		NA	7	7	7	6	5	5	4	3	3	2	1	1	1	1

Tab. 1: Auflistung PSC-prädisponierender Loci und deren Assoziationen mit weiteren Erkrankungen²⁷.

AITD= autoimmune thyroid disease; AS= ankylosing spondylitis; CD= Crohn's disease; CeD= celiac disease; DM= diabetes millitus type 1; MS= multiple sclerosis; PS= psoriasis; RA= rheumatoid arthritis; SARC= sarcoidosis; SLE= systemic lupus erythematosis; SSc= systemic sclerosis; UC= ulcerative colitis; VIT= vitiligo

Eine gestörte Immunregulation könnte in die PSC-Pathogenese impliziert sein, da genetische Assoziationsstudien zur PSC Assoziationen mit Polymorphismen im IL-2-Rezeptor kodierenden Gen aufzeigten. Der IL-2-Rezeptor ist hoch exprimiert auf Foxp3+ regulatorischen T-Zellen (Tregs) zu finden²⁹. Auf der anderen Seite scheint auch eine aberrante Immunzellaktivierung bei der PSC involviert. Hierfür sprechen Assoziationen zwischen PSC und Polymorphismen in Genen, die an der Pathogenbeseitigung und Th17-Differenzierung beteiligt sind. Hierzu zählen CARD9³⁷ und REL³⁶, die beide eine wichtige Rolle bei der

Signaltransduktion nach Pathogenstimulation spielen³⁵ sowie das von Th17-Zellen produzierte IL-21²⁹. REL ist Mitglied der NFκB-Familie und spielt eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion in B-Zellen, T-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen (DCs). CARD9 ist in der Aktivierung von T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen und DCs durch Pathogene involviert und scheint eine mögliche Verbindung zwischen dem Mikrobiom und der Entstehung von PSC herzustellen^{35,38}.

Gallensäuren scheinen auch einen Einfluss auf die PSC-Entstehung auszuüben, wie die Assoziation mit Polymorphismen im Genlocus 2q35, der das Gen für den Gallensäurerezeptor enthält, bekräftigt³⁰. TGR5 ist in die Gallensäure-induzierte Inhibierung von Makrophagen involviert und spielt somit eine schützende Rolle im Kontext des Gallengangschadens. TGR5 ist außerdem mit dem cystischen Fibrose Konduktanzregulator (CFTR) co-lokalisiert und aktiviert diesen. Defekte in CFTR drücken sich in einer hepatobiliären Schädigung aus, die der PSC ähnelt. Außerdem konnte eine reduzierte CFTR-Funktion bei PSC-Patienten festgestellt werden, welche möglicherweise TGR5-bedingt ist³⁵.

1.2.3. Pathogenetische Aspekte

Die starke Assoziation der PSC mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen weist darauf hin, dass die Verbindung zwischen dem Darm und der Leber eine zentrale Rolle im Krankheitsbild der PSC zu spielen scheint^{5,14}. Ein hypothetischer Mechanismus der PSC-Entwicklung ist die Translokation mikrobieller Flora bzw. pathogener Bakterien durch den entzündeten permeablen Darm zur Leber, was dort zur Aktivierung des Immunsystems und Entzündung der Gallengänge führen könnte³⁹. Aber auch eine Reaktion gegen Antigene, die mit dem Blutstrom aus dem Darm zur Leber transportiert werden, könnten durch eine gestörte Immuntoleranz der Leber an der PSC-Pathogenese beteiligt sein⁵.

Auch das aberrante homing von Lymphozyten zwischen der Leber und dem Darm ist möglicherweise in die Pathogenese der PSC involviert^{40,41}. Hierbei wandern durch Kolitis aktivierte intestinale Effektorlymphozyten in die Leber und persistieren dort als Gedächtniszellen, welche eine Leberentzündung auslösen⁴². So findet sich eine gehäufte Infiltration von $\alpha_4\beta_7$ CCR9 CD8+ T-Zellen in PSC-Lebern. Der Phänotyp dieser T-Zellen weist darauf hin, dass diese durch intestinale DCs aktiviert wurden⁴³. Die Migration wird durch Chemokine und Adhäsionsmoleküle vermittelt, die üblicherweise im Darm vorkommen und deren Expression bei der PSC auch in der Leber detektiert wurde. Hierzu zählen CCL25 und MAdCAM-1⁴⁴⁻⁴⁶.





Initiale Auslöser der PSC sind noch unbekannt (oben rechts). Duch Kolitis aktivierte intestinale $\alpha 4\beta 7$ T-Zellen können über MadCAM-1/CCL25 Interaktion vom Darm zur Leber rekrutieren (unten rechts). Zur Entzündungsreaktion in der Leber scheinen vorwiegend T-Lymphozyten und NK-Zellen, aber auch Neutrophile und Makrophagen beizutragen (unten links). Pro-fibrotische Faktoren wie TGF- $\beta 1$ werden im Zuge der Entzündung von Makrophagen und/oder hepatischen Sternzellen sezerniert (oben links). Dies führt zur Fibrosierung der Gallengänge und schließlich zur Leberzirrhose.

Außerdem scheinen hydrophobe Gallensäuren an der Entstehung der PSC beteiligt zu sein, was dem pathogenetischen Mechanismus der Arteriosklerose ähnelt⁴⁷. Der biliäre Verlust der schützenden Hydrogencarbonatschicht auf den Cholangiozyten führt zu einer gesteigerten Membranpermeation hydrophober protonierter Gallensäuren in die Cholangiozyten, was wiederum eine Schädigung der Gallengänge bewirkt⁴⁸. Auch die Assoziation der PSC mit Polymorphismen im Gallensäurerezeptor TGR5 weisen auf eine pathogenetische Rolle von Gallensäuren bei der PSC hin³⁰.

Der Einfluss einer dysregulierten Balance zwischen regulatorischen T-Zellen und pro-inflammatorischen Th17-Zellen auf die Immunpathogenese der PSC wird durch bereits veröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe bestätigt. Wir konnten eine verminderte Treg-Frequenz in der Peripherie und der Leber von PSC-Patienten im Vergleich zu Kontrollgruppen detektieren. Diese reduzierte Treg-Anzahl korreliert signifikant mit Homozygotie im Hauptallel des PSC-assoziierten SNP "rs10905718" im *IL2-RA* Locus⁴⁹. Die Tregs von PSC-Patienten zeigten außerdem eine verminderte immunsuppressive Kapazität im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten, wobei die zu Grunde liegenden Mechanismen noch

geklärt werden müssen⁴⁹. Auf der anderen Seite wiesen PSC-Lebern signifikant mehr IL-17-produzierende Zellen im Vergleich zu Kontrollen auf, die sich vorwiegend im Bereich der Portalfelder um die Gallengänge herum befanden. Zudem zeigten periphere T-Zellen von PSC-Patienten eine verstärkte Th17-Antwort nach Pathogenstimulation, wobei dies unabhängig von einer assoziierten chronischen Darmerkrankung erfolgte⁵⁰.

1.3. Primär Biliäre Zirrhose (PBC) und Autoimmune Hepatitis (AIH)

Die Lebererkrankungen Primär Biliäre Zirrhose und Autoimmune Hepatitis dienten zusammen mit Gesundkontrollen als Vergleichsgruppe für die Ergebnisse der Versuche. Die Krankheitsbilder sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

1.3.1 Primär Biliäre Zirrhose (PBC)

Die Primär Biliäre Zirrhose ist eine chronische, nicht eitrige destruierende Cholangitis, die mit fortschreitender Entzündung zur immunvermittelten Zerstörung der Gallenwege führt. Im Verlauf der Erkrankung kann es zur Fibrose, Cholestase und Leberzirrhose kommen⁵¹. Die Krankheit befällt vorwiegend Frauen mittleren Alters (90-95%) und kommt weltweit vor mit einer Prävalenz von 25-38/100.000 Einwohner^{51,52}.

Die PBC entspricht einer typischen autoimmunen Erkrankung mit hohen IgM-Autoantikörpertitern im Serum und autoreaktiven CD4+ und CD8+ T-Zellen in regionalen Lymphknoten und in der Leber⁵³. Spezifisch für die PBC sind antimitochondriale Autoantikörper (AMAs), die reaktiv gegen einen Enzymkomplex der Pyruvat-Dehydrogenase (M2-Antigen) sind und als Anti-M2-Typ bezeichnet werden. Ihr Zielantigen ist die E2-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenasekomplexes (PDC-E2)^{54,55}. Da sie in 90%-95% der Patienten vorkommen und auch schon Jahre vor der klinischen Diagnose der Cholestase identifiziert werden können, werden sie zur Krankheitsdiagnostik eingesetzt⁶. Auch die autoreaktiven T-Zellen, die sich um die intrahepatischen Gallengänge konzentrieren, erkennen die E2-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenasekomplexes und zerstören so spezifisch die PDC-E2-exprimierenden Zellen. Hierbei wurden die CD8+ T-Zellen vorwiegend als die Effektorzellen identifiziert⁵². Desweiteren können antinukleäre Autoantikörper in 25%-40% der Patienten gefunden werden⁵⁶.

Die Ätiologie der PBC ist nicht bekannt, es scheint aber eine genetische Prädisposition vorzuliegen, da die Prävalenz der PBC bei Verwandschaft ersten Grades um das hundertfache erhöht ist im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung⁵⁷. Genomweite Assoziationsstudien weisen

auf Grund einer starken Assoziation der PBC mit bestimmten HLA-Haplotypen und weiteren PBC-spezifischen Loci wie dem *IL-12A-* und *IL-12RB2-*Locus auf eine genetische Prädisposition der PBC hin^{58,59}. Umweltfaktoren wie Viren, toxische Gallensäuren, Xenobiotika und Bakterien werden als mögliche Auslöser der Erkrankung bei genetisch prädisponierten Individuen betrachtet. Rauchen oder die Einnahme von Hormonersatztherapien gelten als Risikofaktoren für die Entwicklung einer PBC⁶⁰. Auch ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Th17-Zellen und Tregs scheint eine wichtige Rolle bei der Entstehung der PBC zu besitzen⁵².

Da die meisten PBC-Patienten bei der Erstdiagnose asymptomatisch sind, sind erhöhte Cholestaseparameter wie die der alkalischen Phosphatase, das Auftreten von AMAs im Serum und eine histologisch destruktive Cholangitis diagnoseweisend⁵⁴. Die häufigsten Symptome der PBC sind unspezifisch und beinhalten stark ausgeprägte Müdigkeit und Pruritus⁵⁴. Etwa 32% der Patienten entwickeln im Verlauf der Krankheit weitere autoimmune Begleiterkrankungen wie das Sicca-Syndrom⁶¹.

Die Krankheit schreitet langsam voran, meist über mehrere Jahrzehnte. Die medikamentöse Therapie besteht in der Gabe von Ursodesoxycholsäure (UDCA), was die Serumspiegel der alkalischen Phosphatase verringert, aber nur einen geringen Effekt auf die nicht spezifischen Symptome wie Müdigkeit und Juckreiz hat⁵⁴. Im späten Stadium der PBC bleibt die Lebertransplantation das Verfahren der Wahl mit guter Prognose⁵¹.

1.3.2 Autoimmune Hepatitis (AIH)

Die Autoimmune Hepatitis ist eine Lebererkrankung unbekannter Ätiologie, die sich in akuter und chronischer Form präsentieren kann⁶². Initial wurde sie bei jungen Frauen entdeckt und gilt mit einer Prävalenz von 10-20/100.000 in Nordeuropa als seltene Erkrankung. Die AIH betrifft Frauen viermal häufiger als Männer und kann sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen auftreten^{63,64}.

Die AIH zeigt auf Grund einer genetischen Prädisposition, der Assoziation mit anderen Autoimmunerkrankungen, dem Auftreten von Autoantikörpern, autoreaktiven T-Zellen und inflammatorischen Infiltraten und dem guten Ansprechen auf Immunsuppressiva alle Merkmale einer Autoimmunerkrankung⁶². Die genetische Prädisposition zeigt sich in der starken Assoziation der AIH mit spezifischen HLA-Haplotypen wie dem HLA-DR3 und HLA-DR4⁶⁵. Im Laufe der Erkrankung kommt es gehäuft zu weiteren extrahepatischen Autoimmunerkrankungen wie dem Sjögren-Syndrom oder autoimmunen Erkrankungen der Schilddrüse^{62,66}.

Der pathogenetische Mechanismus der AIH ist unklar, scheint aber multifaktoriell zu sein⁶⁴. Es wird vermutet, dass unter anderem äußere Faktoren wie Toxine oder virale Infektion in genetisch anfälligen Individuen die Krankheit auslösen können⁶⁷. Auch der Verlust der Immuntoleranz der Leber durch eine gestörte Funktion bzw. verminderte Frequenz an Leberantigen-spezifischen Foxp3+ Tregs wird diskutiert⁶⁸. Welche Funktion die bei der AIH oftmals auftretenden Autoantikörper auf die Pathogenese haben, ist nicht geklärt⁶⁹.

Die klinischen Symptome der AIH variieren stark und beinhalten unspezifische Symptome wie Müdigkeit oder Gelenkschmerzen. Bei etwa 1/3 der Patienten treten Übelkeit, Oberbauchbeschwerden und oftmals ein akuter Ikterus auf, was auf eine akute Präsentation der AIH hinweist^{70,71}. Das heterogene Auftreten der AIH macht ihre Diagnose schwierig, so dass man sich auf vier diagnostische Kriterien zum Nachweis einer AIH festgelegt hat: das Auftreten von Autoantikörpern, eine Hypergammaglobulinämie, die Leberhistologie und das Fehlen einer viralen Hepatitis^{69,72}. Die Aminotransferasewerte sollten zusätzlich erhöht vorliegen⁶⁴. Histologisch lassen sich aus T-Zellen und Plasmazellen bestehende Infiltrate in den Portalfeldern der Leber nachweisen⁷³. Die Grenzzonenhepatitis, die auch als Interface-Hepatitis bezeichnet wird, ist typisch für die AIH⁷⁴. Es kommt zur Fibrose und in seltenen Fällen zu Brückennekrosen, wobei es sich um Verbindungen zwischen den Nekrosen benachbarter Portalfelder handelt⁷⁵.

In der AIH kommen unterschiedliche Autoantikörper vor, was zu einer AIH-Klassifizierung in 2 Subtypen führt^{69,73}. Bei der AIH vom Typ 1 treten ANA (anti-nukleäre Autoantikörper), SMA (Autoantikörper gegen die glatte Muskulatur) und/oder SLA/LP-Autoantikörper (Autoantikörper gegen das lösliche Leberantigen) auf. Die AIH vom Typ 2 zeichnet sich durch das Auftreten von anti-LKM (Autoantikörper gegen Mikrosomen in Leber und Milz) aus⁶⁹. Hierbei sind nur die SLA/LP-Autoantikörper spezifisch für die AIH und haben somit eine wichtige Rolle in der AIH-Diagnose. Es wurde zeitweise diskutiert, Patienten mit SLA/LP-Autoantikörpern einem dritten Subtyp der AIH zuzuordnen, was aber auf Grund des gleichen klinischen Verlaufs wieder aufgegeben wurde⁷⁶.

Als Standardtherapie bei der AIH werden Glukokortikoide und Azathioprin eingesetzt, was in etwa 85% der Patienten eine Remission induziert, die aber nur durch dauerhafte Einnahme von Immunsuppressiva aufrechterhalten werden kann. Patienten unter optimaler Therapie weisen eine normale Lebenserwartung auf^{64,77}. Die Lebertransplantation bleibt die einzige Therapie bei Patienten mit fortgeschrittener Lebererkrankung trotz Einsatz von Immunsuppressiva⁷⁸. Eine unbehandelte AIH ist assoziiert mit einer schlechten Prognose und Mortalitätsraten um die 50% innerhalb von 5 Jahren⁷⁹.

1.4. CD4+ T-Helferzellen

CD4+ T-Helferzellen spielen eine zentrale Rolle in der normalen Funktion des Immunsystems. Sie koordinieren die Expansion und Regulierung von CD8+ T-Zellen, unterstützen die B-Zellantwort und sind an der Rekrutierung und Modulierung der Komponenten des angeborenen Immunsystems beteiligt⁸⁰. CD4+ T-Helferzellen existieren in einer epigenetischen Vielzahl mit unterschiedlichen Funktionen, Phänotypen und Persistenzkapazitäten. Hierzu zählen Th1-Zellen, Th2-Zellen, Th17-Zellen, die regulatorischen T-Zellen und die erst wenig beschriebenen T-follikulären Helfer-Zellen (Tfh-Zellen), Th9-Zellen und Th22-Zellen^{80,81}.

Th1-Zellen werden mit Hilfe von IL-12 induziert und exprimieren den Transkriptionsfaktor T-bet. Sie produzieren IFNγ, was zur Aktivierung von Makrophagen führt und somit die zelluläre Immunität gegenüber intrazellulären Pathogenen induziert. Th1-Zellen regulieren außerdem die CD8-Antwort und die Makrophagenrekrutierung und Aktivierung⁸².

Th2-Zellen werden in Anwesenheit von IL-4 induziert und exprimieren spezifisch den Transkriptionsfaktor GATA3⁸³. Sie produzieren die Interleukine IL-4, IL-5 und IL-13 und sind mit der humoralen Immunantwort gegenüber extrazelluären Organismen oder Parasiten und der Entwicklung von allergischen Reaktionen assoziiert⁸⁴.

Es gibt mehrere Klassen von regulatorischen CD4+ T-Zellen, zu denen die Foxp3+ Tregs, die Tr1-Zellen und die Th3-Zellen gehören. Sie werden später noch genauer beschrieben.

Tfh-Zellen exprimieren CXCR5 und wandern vorwiegend in die Lymphknoten, wo sie bei der B-Zellantwort involviert sind und IL-21 produzieren⁸⁵. Funktionell ist über Th22- und Th9-Zellen noch nicht viel bekannt. Th22-Zellen exprimieren das Zytokin IL-22 und scheinen die Funktion von mesenchymalen und epithelialen Zellen zu beeinflussen⁸⁶. Th9-Zellen, die das Zytokin IL-9 produzieren, scheinen einen regulatorischen und überlebensfördernden Effekt auf viele lymphoide und myeloide Zellen zu haben⁸⁷ und sind am allergischen Asthma und Autoimmunität beteiligt⁸⁸.

Zu den CD4+ T-Helferzellen gehören noch die Th17-Zellen, auf die im nächsten Abschnitt näher eingegangen werden soll.



Abb. 2: Differenzierung naiver CD4+ T-Zellen⁸⁹.

1.4.1. Th17-Zellen

Eine dysregulierte Immunantwort nach Pathogenstimulation scheint an der Pathogenese der PSC beteiligt zu sein und wurde schon für die assoziierten inflammatorischen Darmerkrankungen postuliert⁹⁰. Hierfür spricht, dass die Galle, aber auch die Leber von PSC-Patienten mit pathogenen Bakterien und Pilzen besiedelt ist, die dort möglicherweise die Rekrutierung von Immunzellen induzieren können⁵⁰. Die Keime scheinen die Leber entweder über die biliären Epithelbarrieren zu erreichen oder mit dem portalen Blutfluss. Th17-Zellen, die eine wichtige Rolle in der Beseitigung dieser extrazelluären Pathogene spielen, könnten an der Pathogenese der PSC beteiligt sein⁵⁰. Auch Genomweite Assoziationsstudien weisen eine starke Verbindung zwischen PSC und Polymorphismen in Genen auf, die an der Pathogenbeseitigung und Th17-Differenzierung beteiligt sind. Hierzu zählen das von Th17-Zellen produzierte IL-21 sowie CARD9 und REL, die beide eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion nach Pathogenstimulation spielen³⁵. PSC ist außerdem stark mit Polymorphismen im Genlocus von FUT2 assoziiert. FUT2 scheint einen signifikanten Einfluss auf die bakterielle Zusammensetzung in den Gallengängen zu haben³⁶.

Th17-Zellen exprimieren den Transkriptionsfaktor RORc (human) bzw. RORγt (murin) (retinoic acid-related orphan receptor gamma-t) und produzieren die Zytokine IL-17A (IL-17), IL-17F, ein Heterodimer bestehend aus IL-17A/IL-17F, IL-21, IL-22, den Granulozyten Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) und viele weitere Faktoren^{80,91,92}.

Unter physiologischen Bedingungen befinden sie sich vorwiegend in der Lamina Propia des Dünndarms, werden aber während einer Infektion auch an weiteren Mukosa-assoziierten Bereichen induziert. Th17-Zellen tragen im Gastrointestinaltrakt, den Atemwegen, der Lunge und der Haut an der Abwehr gegen bakterielle und fungale Pathogene bei⁹³ und scheinen an vielen immunologischen Prozessen wie der Entstehung von Autoimmunerkrankungen (Rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose, Lupus Erythematodes, etc.), inflammatorischen Erkrankungen, Tumoren, Transplantatabstoßung und Infektionen beteiligt zu sein. Es ist noch nicht geklärt, ob IL-17 eine direkte Rolle in der Pathogenese dieser Erkrankungen hat oder nur als Konsequenz der inflammatorischen Antwort amplifiziert wird⁹⁴.

Der pro-inflammatorische Effekt von IL-17 wird über den IL-17-Rezeptor vermittelt, der aus den Untereinheiten IL-17RA und IL-17RC besteht und von vielen Zellen des Immunsystems (T-Zellen, B-Zellen, Neutrophilen) und anderen Geweben (Epithel, Endothel, Fibroblasten) exprimiert wird⁹⁵. Somit ist IL-17 stark pleiotrop und verursacht eine Vielzahl inflammatorischer Effekte, die die adaptive Immunität mit der angeborenen verbindet⁹⁶. IL-17 induziert die Produktion von GM-CSF, TNF α , IL-1 β , IL-6 und vieler weiterer inflammatorischer Chemokine und Zytokine, die die Migration von Granulozyten zum Ort der Entzündung steigern⁹⁷. Außerdem ist IL-17 auch an der Entstehung sekundärer lymphoider Gewebe nach einer lokalen Infektion beteiligt⁹⁸.

IL-17 und Th17-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr gegen bakterielle und fungale Erreger wie *Staphylococcus aureus* oder *Candida albicans*^{93,99}. IL-17 defiziente Mäuse weisen eine verschlechterte Abwehr gegen *Streptococcus pneumoniae* auf¹⁰⁰. IL-17 und IL-22 scheinen synergistisch die Produktion vieler antimikrobieller Peptide und Proteine zu steuern¹⁰¹, wobei IL-22 über den IL-22-Rezeptor wirkt, der vorwiegend von nicht-hämatopoetischen Zellen wie den Keratinozyten, Hepatozyten und Enterozyten exprimiert wird. IL-22 scheint auch eine protektive Wirkung auf das Gewebe bei Infektion mit Gram-negativen Bakterien zu haben¹⁰².

Die Differenzierung humaner Th17-Zellen wird kontrovers diskutiert⁹¹. Die Zytokine IL-1 β und IL-6 sind wahrscheinlich an der initialen Differenzierung von Th17-Zellen beteiligt. IL-1 β scheint hierbei der entscheidende Faktor der Th17-Differenzierung zu sein, der zusammen mit einem oder mehreren anderen Zytokinen die IL-17-Produktion induziert¹⁰³. Auch IL-21 und IL-23 scheinen an der Entwicklung und Stabilisierung von humanen Th17-Zellen beteiligt zu sein¹⁰⁴. Die Th1- und Th2-spezifischen Zytokine IFN γ und IL-4 haben wahrscheinlich einen inhibierenden Einfluss auf die Entwicklung von Th17-Zellen¹⁰⁵.

Die Rolle von TGF- β in der humanen Th17-Polarisierung ist unklar^{80,106}. In geringen Konzentrationen scheint TGF- β die IL-2-vermittelte Aktivierung von STAT5 zu inhibieren, was die Expression der Th1- und Th2-spezifischen Transkriptionsfaktoren T-bet und GATA3 unterdrückt¹⁰⁷. Somit scheint TGF- β indirekt an der initialen Th17-Differnzierung beteiligt zu sein^{107,108}. In hohen Konzentrationen scheint TGF- β die Differenzierung naiver CD4+ T-Zellen eher in Richtung induzierter Foxp3+ Tregs (iTregs) zu lenken und die Expression des IL-23-Rezeptors durch ROR γ t-Antagonisierung zu inhibieren¹⁰⁹. Auch das Treg-induzierende Zytokin IL-2 scheint die Th17-Differenzierung zu antagonisieren¹¹⁰. Somit besteht eine reziproke Beziehung zwischen den Th17-Zellen und den iTregs, wobei die iTregs in einem inflammatorischem Milieu den Th17-Phänotyp adaptieren können, so dass deren suppressive Kapazität wegfällt und eine schnelle pro-inflammatorische Antwort induziert wird¹¹¹.

Th17-Zellen weisen starke Kontext-abhängige Plastizität auf, vorwiegend durch IL-23 induziert, und sind in der Lage die funktionelle Charakteristik von Th1-Zellen anzunehmen, so dass sie sowohl IL-17 als auch IFNγ und die beiden Transkriptionsfaktoren RORγt und T-bet co-exprimieren und besonders pathogen wirken^{112,113}. Diese Th17-Plastizität scheint an der Abwehr gegen Mikroben, an der Entwicklung von Autoimmunität und an der Bekämpfung von Tumoren beteiligt zu sein⁸⁰. Somit scheint die Annahme einer Th1-Antwort als vorherrschenden Effektorweg in Autoimmunerkrankungen überholt und es wird von einer treibenden Th17-Antwort ausgegangen, die Th1-Charakteristika aufweisen kann¹¹⁴.

Die Gewebeschädigung durch Th17-Zellen kann direkt erfolgen oder indirekt via Rekrutierung von Neutrophilen und Makrophagen durch die Produktion der inflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und des chemotaktischen Faktors für myeloide Zellen CCL20¹¹⁵. Zusätzlich exprimieren Th17-Zellen den CCL20-Rezeptor CCR6 in großen Mengen auf ihrer Oberfläche¹¹⁶. Die Th17-Produktion von GM-CSF wirkt wiederum auf die myeloiden Zellen, indem es deren Produktion von IL-1, IL-6, IL-23 und MHCII verstärkt¹¹⁷.

1.4.2. Regulatorische T-Zellen

Ein möglicher Einfluss von regulatorischen T-Zellen auf die Pathogenese der PSC wird postuliert, da Genomweite Assoziationsstudien eine Assoziation zwischen PSC und Polymorphismen im Locus für den IL-2-Rezeptor und IL-2/IL-21 aufwiesen, die für die Treg-Funktion und -Generierung relevant sind^{31,37}. Diese Hypothese wird dadurch bestärkt, dass bei IL-2-Rezeptor defizienten Mäusen funktionelle Tregs fehlen und sie eine Kolitisassoziierte autoimmune Cholangitis entwickeln, die starke Ähnlichkeit zur PSC hat¹¹⁸. In unserer Arbeitsgruppe konnten wir bereits zeigen, dass die Treg-Frequenz in der Peripherie und

der Leber von PSC-Patienten im Vergleich zu Kontrollgruppen vermindert vorlag und auch deren immunsuppressive Funktion reduziert war⁴⁹.

1995 entdeckten Sakaguchi et al, dass es eine regulatorische T-Zellpopulation gibt, die in der Lage war, Autoimmunität in Mäusen zu unterbinden¹¹⁹. Diese regulatorischen T-Zellen spielen eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz und der Immunhomöostase, da sie für den Wirt potentiell schädliche Immunantworten limitieren¹²⁰. Nach Stimulation ihres T-Zellrezeptors supprimieren sie die Aktivierung, Proliferation und Effektorfunktion von CD4+ und CD8+ T-Zellen, NK-Zellen, NKT-Zellen, DCs, B-Zellen, Makrophagen und Osteoklasten¹²¹. Diese Inhibierung kann sowohl Antigen-spezifisch als auch Antigen-unspezifisch erfolgen, wobei erstere effektiver ist¹²².

regulatorischen T-Zellen Die umfassen mehrere Subpopulationen, zu denen CD4+CD25+Foxp3+ T-Zellen (Tregs), Typ I regulatorische T-Zellen (Tr1-Zellen) und Th3-Zellen gehören^{123,124}. Tregs sind durch die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 charakterisiert und kontrollieren Entzündungsreaktionen. Dies kann durch Sekretion anti-erfolgen^{125,126}. IL-10 besitzt eine immunregulatorische anti-inflammatorische Funktion, indem es unter anderem die Expression von Chemokinen, pro-inflammatorischen Molekülen und inhibiert¹²⁷. MHCII-Molekülen Tr1-Zellen exprimieren keinen spezifischen Transkriptionsfaktor, so dass ihre Identität als eigenständige T-Zelllinie noch diskutiert wird¹²⁸. Die Sekretion großer Mengen an IL-10 und TGF-ß sowie die Eliminierung myeloider antigenpräsentierender Zellen durch Granzym B sind die Hauptcharakteristika der Tr1-vermittelten Suppression^{129,130}. Auch Th3-Zellen sezernieren große Mengen an IL-10 und TGF- β^{131} . Während die natürlichen Tregs (nTregs) schon im Thymus entstehen, werden die Tr1-Zellen, Th3-Zellen und induzierten Tregs (iTregs) erst in der Peripherie aus naiven CD4+ T-Zellen induziert¹³².

Für Tregs ist der forkhead/winged helix Transkriptionsfaktor (Foxp3) entscheidend an der Entwicklung und Funktion beteiligt¹²⁰ und gilt in Mäusen als relativ spezifischer zellulärer Marker. Beim Menschen ist die Foxp3-Expression hingegen nicht spezifisch für Tregs, da Foxp3 auch nach Aktivierung in konventionellen CD4+ T-Zellen induziert werden kann¹³³. Einige Gruppen zeigten, dass humane CD4+Foxp3+ T-Zellen, die eine geringe Oberflächenexpression von CD127 (α -Kette des IL-7-Rezeptors) zeigten, eine verstärkte immunsupprimierende Aktivität aufwiesen¹³⁴. Somit scheint die Kombination von CD4+CD25^{high}CD127^{low}Foxp3+ geeignet um humane Tregs zu identifizieren. Die stabile Expression von Foxp3 wird epigenetisch reguliert, wobei es durch Demethylierungen an CpG-Motiven im Foxp3-Promotor zur verstärkten Transkription des Foxp3-Gens und einer verbesserten suppressiven Kapazität kommt¹³⁵. Die im Thymus gereiften natürlichen Tregs (nTregs) weisen eine vollständige Demethylierung dieser CpG-Motive auf und zeigen eine stabile Foxp3-Expression, die unabhängig von den äußeren Bedingungen ist. Im Gegensatz dazu weisen *in vitro* induzierte Tregs (iTregs) keine vollständige Demethylierung im Foxp3-Promotor auf, was zu ihrer Instabiltät und Plastizität führt. Sie haben im Vergleich zu den nTregs eine transientere Expression ihrer funktionell assoziierten Moleküle, zu denen z.B. Foxp3 und CTLA-4 gehören¹³⁶. Ein weiterer Unterschied zwischen nTregs und iTregs scheint die Expression von Helios zu sein, der als Marker für nTregs gilt¹³⁷.

Die *in vitro* Konversion von iTregs aus naiven CD4+ T-Zellen erfolgt in Gegenwart von hohen Konzentrationen von TGF- β und in Abwesenheit des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6. Der Wachstumsfaktor IL-2 fördert hierbei die Treg-Konversion und inhibiert die Th17-Differenzierung¹¹⁰.

Die suppressive Funktion der Tregs scheint hauptsächlich Zellkontakt-abhängig zu sein und geschieht auf mannigfaltige Weise¹³⁸. Hierzu zählen z.B. die Eliminierung von Effektor-T-Zellen oder antigenpräsentierenden Zellen in einem Granzym- oder Perforinabhängigen Mechanismus sowie die CTLA-4-abhängige Herunterregulierung der co-stimulierenden Moleküle CD80/86 auf DCs¹³⁹. Auch die Moleküle Galectin-9/Tim-3^{140,141}, GITR und PD-1¹³² scheinen funktionelle Relevanz bei der Zellkontakt-abhängigen Suppression zu besitzen.

Außerdem trägt die Sekretion immunsupprimierender Zytokine wie TGF- β , IL-10¹⁴² und IL-35¹⁴³ sowie die Absorption von Wachstumsfaktoren wie IL-2 zur Funktion von Tregs bei¹⁴⁴. Ein weiterer Mechanismus der Treg-Suppression läuft über das suppressive Molekül GARP¹⁴⁵. Das transmembrane GARP (glycoprotein-A repetitions predominant) wird spezifisch nur auf der Oberfläche stimulierter Tregs exprimiert¹⁴⁵ und bindet dort an einen Komplex, der als latentes TGF- β bezeichnet wird. Dieser entsteht bei der intrazellulären Spaltung von pro-TGF- β und setzt sich aus den miteinander assoziierten Spaltprodukten LAP (Latency Associated Peptide) und reifem TGF- β zusammen^{146,147}. Vermutlich führt die proteolytische Spaltung von LAP zur Aktivierung des latenten TGF- β auf der Treg-Oberfläche, was letztlich die Freisetzung von aktivem TGF- β induziert¹⁴⁸, welches aber nur parakrin auf umgebende Zellen wirkt¹⁴⁹.

1.5. MAIT-Zellen

Die PSC ist stark mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und einer Keimbesiedlung der Galle assoziiert, so dass die antimikrobiellen Mukosa-assoziierten invarianten T-Zellen (MAIT-Zellen) eine Rolle bei der Entzündungsreaktion in der Leber von PSC-Patienten spielen könnten^{5,7}.

Die hämatopoetischen MAIT-Zellen sind evolutionär in Säugetieren konserviert und MR1 restringiert^{150,151}. Molekül) Sie (nicht-klassisches MHC-1b exprimieren einen hochkonservierten T-Zellrezeptor mit einer invarianten α -Kette, die sich beim Menschen aus dem AV1-Segment (Va7.2) zusammensetzt, das mit dem TCRAJ33 (Ja33) und CDR3 einer konstanten Länge assoziiert ist¹⁵². Der T-Zellrezeptor ist semiinvariant, weil die invariante α -Kette variabel mit einer begrenzten Zahl an V β -Segmenten assoziiert ist¹⁵³. Dieser T-Zellrezeptor ist gegen Vitamin B-Metabolite gerichtet, die in fast allen Bakterien und Pilzen, aber nicht in Viren, vorkommen und eine neue Klasse von Antigenen darstellen¹⁵⁴. Die Präsentation der Antigene erfolgt über das nicht klassische MR1-Molekül, das mit bis zu vorliegt¹⁵⁴. 80%-98% Sequenzhomologie zwischen den Spezies Diese starke MR1-Konservierung weist auf einen selektiven evolutionären Druck hin, der nur eine begrenzte Menge an Polymorphismen zuließ¹⁵⁵.

Die Expression von Chemokinrezeptoren wie CCR6, CXCR6 und CXCR9 weist auf einen Gewebetropismus der MAIT-Zellen hin, wobei sie bevorzugt im Darm, der Lunge und der Leber gefunden werden^{150,156}. Nach Aktivierung sezernieren MAIT-Zellen sehr schnell pro-inflammatorische Zytokine wie IFN γ und TNF α und scheinen mit die Hauptproduzenten von IL-17 in der humanen Leber zu sein^{157,158}. Diese Effektoraktivität weist auf ihre antimikrobiellen Eigenschaften hin, die sie nach Rekrutierung zu Infektionsherden entfalten¹⁵⁰. Sie scheinen daher eine Schlüsselrolle bei der frühen Erkennung und Kontrolle mikrobieller Infektionen zu spielen¹⁵⁵.

MAIT-Zellen verlassen den Thymus mit einem naiven Phänotyp, bevor sie in der Peripherie zu Gedächtniszellen expandieren, die CD45RO und Aktivierungsmarker wie CD161 exprimieren¹⁵⁹. Sie sind eine homogene oligoklonale Zellpopulation, die 1%-10% der T-Zellen im humanen Blut und 20%-40% der Leberlymphozyten darstellt und eine direkte MR1-abhängige antibakterielle Reaktivität besitzt^{156,159}. Im Gegensatz zum Menschen weisen Mäuse kaum MAIT-Zellen auf¹⁵², besitzen aber höhere Frequenzen an invarianten NKT-Zellen (iNKT), welche vorwiegend in der Leber und der Milz zu finden sind¹⁶⁰.

Die periphere MAIT-Zellfrequenz scheint in Krankheiten mit einer gestörten Balance des Darmmikrobioms modifiziert zu sein, was bereits für Multiple Sklerose, Diabetes und chronisch entzündliche Darmerkrankungen beschrieben wurde^{161,162}. Ob MAIT-Zellen in die Pathogenese dieser Erkrankungen mechanistisch impliziert sind oder nicht spezifisch aus dem Blut zu den Entzündungsstellen wandern, ist noch nicht geklärt¹⁵⁰.

1.6. Apoptose von T-Zellen

Eine defekte Apoptose in T-Zellen kann zu Autoimmunität und malignen Lymphomen führen und könnte einer der pathogenetischen Mechanismen der PSC sein. Hierfür spricht, dass Genomweite Studien Assoziation zwischen PSC und Polymorphismen im *BCL2L11*-Gen aufwiesen, welches für das pro-apoptotische Bim kodiert ^{27,35}.

Apoptose ist ein Prozess des regulierten programmierten Zelltodes, bei dem es zu keiner Schädigung des umliegenden Gewebes kommt. Sie spielt eine kritische Rolle in der Entwicklung, Gewebehomöostase und der Immunität, so dass eine beeinträchtigte Funktion zu pathologischen Erkrankungen wie Krebs, Autoimmunität, Infektionen und degenerativen Erkrankungen führen kann¹⁶³⁻¹⁶⁵.

Die Apoptose endet final in der Aktivierung von Caspasen, einer Familie von Aspartatspezifischen Cysteinproteasen, wodurch es zum Abbau essentieller Zellproteine kommt^{164,165}. Morphologisch ist sie durch Chromatinkondensation und Schrumpfen des Nukleus und des Zytoplasmas charakterisiert, was letztlich zur Fragmentierung der Zellen in Plasmamembrangebundene apoptotische Körperchen führt. Diese werden anschließend von umgebenden phagozytotischen Zellen aufgenommen und in deren Lysosomen abgebaut¹⁶⁶.

Die kontrollierte Expansion und Kontraktion von Lymphozyten während und nach einer adaptiven Immunantwort ist nötig für die richtige Funktion des Immunsystems¹⁶⁷. Täglich werden Millionen an Leukozyten vom hämatopoetischen System gebildet, wobei viele durch Apoptose eliminiert werden bevor sie den Blutstrom erreichen, z.B. auf Grund eines dysfunktionellen T-Zellrezeptors¹⁶⁸. Im Verlauf einer Immunantwort kommt es zur Aktivierung und klonalen Expansion von T-Zellen, was die Produktion vom T-Zellwachstumsfaktor IL-2 und die Hochregulierung seines Rezeptors auf der T-Zellmembran induziert. Die relative Menge an Antigen und IL-2 im umgebenden Milieu bestimmt letztlich über die Proliferation und das Überleben der T-Zellen¹⁶⁹. Nach Beendigung der Immunantwort sinken die Konzentrationen an Wachstumsfaktoren wie IL-2 ab und die meisten Effektor-T-Zellen gehen durch Apoptose zu Grunde, um so die Homöostase aufrecht zu erhalten. Nur wenige der T-Zellen verbleiben als Gedächtniszellen, so dass ein Schutz vor einer wiederkehrenden Infektion mit demselben Erreger bestehen bleibt¹⁶⁴.

Die Induktion des programmierten Zelltodes von T-Zellen kann in Vertebraten auf zwei Signalwegen geschehen, die final bei der Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7 zusammenlaufen¹⁷⁰: der extrinsische Restimulierungs-induzierte Zelltod (RICD) und der Zytokinentzug-induzierte Zelltod (CWID)^{169,171}. Defekte sowohl im RICD als auch im CWID führen zur exzessiven T-Zellakkumulation in unterschiedlichen Stadien der Immunantwort und stören so die Immunhomöostase¹⁷¹.

Während einer noch bestehenden Immunantwort induziert eine Restimulierung des T-Zellrezeptors einer bereits aktivierten reifen T-Zelle den programmierten Zelltod. Der RICD erfolgt in Anwesenheit von IL-2 und dem Antigen und unterbindet eine überschießende T-Zellexpansion. Somit sorgt der RICD auch dafür, dass weitere T-Zellklone ausreichend "Platz" erhalten, um auf Antigene zu reagieren und zu proliferieren¹⁷². Der RICD etabliert daher einen suizidalen Schutzmechanismus für aktivierte T-Zellen, der auf der Quantität und Qualität des Antigenstimulus, der Wachstumsfaktoren und weiterer Umweltfaktoren beruht. Diese Selbstregulierung minimiert Gewebeschäden durch eine Infektion, wobei in einem funktionierenden Immunsystem eine Balance zwischen Pathogenbeseitigung und T-Zellregulierung besteht¹⁷¹. Defekte im RICD wurden in Patienten mit einer X-gekoppelten lymphoproliferativen Erkrankung (XLP) gefunden, bei der es auf Grund eines persistierenden viralen Antigens zu einer Hyperproliferation der Lymphozyten kommt¹⁷³.

Die Induktion des programmierten Zelltodes erfolgt beim RICD vorwiegend auf einem extrinsischen Signalweg über die Todesrezeptoren (DR) der Tumornekrose-Faktor-Rezeptor Superfamilie (TNFR) an der zytoplasmatischen Zellmembran. Hierzu zählt auch das transmembrane Protein Fas (CD95), das als Homotrimer vorliegt und durch Bindung vom trimeren membrangebundenen Fas-Liganden (CD95L) in *cis* oder *trans* aktiviert wird. Dies induziert die Bildung eines Tod-induzierenden Signalkomplexes (DISC), welcher aus Fas und FADD (Fas-assoziierte Todesdomäne) besteht und wiederum als Plattform für die Rekrutierung und autokatalytische Aktivierung der Procaspasen 8 und 10 dient¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. Die Expression von Fas-Ligand muss streng kontrolliert vorliegen, da es sonst zur unkontrollierten Apoptose gesunder Zellen kommen kann¹⁷⁷. Mutationen des Fas-Rezeptors, welche zu einem dysfunktionellen Rezeptor führen, wurden in Patienten mit autoimmunen lymphoproliferativen Syndrom entdeckt^{178,179}.

Fas und Fas-Ligand scheinen eine Schlüsselrolle beim RICD zu spielen, da die Inhibierung der Bindung des Fas-Liganden an Fas die Zellen resistent gegenüber dem RICD macht¹⁸⁰. Die Restimulierung des T-Zellrezeptors scheint IL-2-abhängig die Expression des Fas-Liganden zu induzieren, was zu einer gesteigerten Bildung des DISC führt¹⁸¹. Auch der Bim-abhängige intrinsische Signalweg des CWID scheint am RICD beteiligt zu sein, da Thymozyten ohne Bim nach Restimulierung des T-Zellrezeptors resistent gegenüber dem programmierten Zelltod sind¹⁷¹. Außerdem führt die T-Zellrezeptorrestimulierung in Anwesenheit von IL-2 auch zur Hochregulierung von Bim und zur Fas-unabhängigen Permeabilisierung der Mitochondrienmembran¹⁸². Somit scheinen sowohl Fas- als auch Bim-induzierte apoptotische Signale den RICD zu optimieren¹⁷¹.

Der Zytokinentzug-induzierte Zelltod (CWID) kontrolliert die Kontraktion der T-Zellen nach einer erfolgreichen adaptiven Immunantwort, so dass nur eine geringe Menge an Gedächtniszellen erhalten bleibt¹⁸³. Es wurde gezeigt, dass Tregs den CWID benutzen um Immunantworten zu supprimieren, indem sie eine erhöhte Affinität zu IL-2 und eine gesteigerte Expression des IL-2-Rezeptors (CD25) auf ihrer Oberfläche im Vergleich zu aktivierten Effektor-T-Zellen aufweisen und somit deren Zelltod begünstigen¹⁴⁴.

Die Induktion der Apoptose erfolgt beim CWID intrinsisch und wird kontrolliert durch die relative Expression der Mitglieder der Bcl-2 Familie, die das äußere mitochondrielle Membranpotential (MOMP) regulieren¹⁶⁴. Nach Depolarisierung der Membran wird Cytochrom c ins Zytosol entlassen, was zur Aktivierung des Apoptosoms führt, das aus APAF1 (apoptotischer Protease-aktivierender Faktor 1), Cytochrom c und Procaspase 9 besteht. Dies induziert die Spaltung der Procaspase 9 im Apoptosom und weiterer Caspasen, was schließlich zum Zelltod führt^{164,184}.

Die Bcl-2 Familie besteht aus 3 Gruppen mit pro- bzw- anti-apoptotischer Funktion, die starke Homologien in bis zu vier ihrer als BH-Domänen (BH1-4) bezeichneten Regionen besitzen¹⁸⁵. Die anti-apoptotischen Mitglieder Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl1, A1 und Boo unterbinden die Funktion der pro-apoptotischen Effektoren Bax und Bak, welche die direkte Permeabilisierung der Mitochondrien induzieren¹⁸⁶. Bax und Bak sind somit direkte Effektoren des Bcl-2 regulierten Signalwegs, wobei Bak ein integrales Membranprotein der äußeren Mitochondrienmembran ist und Bax im Zytosol vorliegt¹⁸⁷. Die pro-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie Bim, Bad, Bik, Bid, Harakiri, Noxa, Puma und Bmf detektieren Stresssignale, aktivieren die pro-apoptoischen Effektoren Bax und Bak und antagonisieren wiederum die anti-apoptotischen Bcl-2 Mitglieder¹⁸⁵. Ihre Bindung an die Effektoren Bax und Bak sowie an die anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie erfolgt über ihre α -helikale BH3-Domäne¹⁸⁸.

Das pro-apoptotische Protein Bim (Bcl-2-interacting mediator of cell death) scheint eine Schlüsselrolle im intrinsischen Signalweg der Apoptose zu besitzen, da CWID die Expression von Bim hochreguliert und Bim aktiviert^{163,189}. Bim antagonisiert sowohl die anti-

apoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie und aktiviert Bax und Bak, welche die Mitochondrienmembran permeabilisieren¹⁹⁰. Die pro-apoptotische Funktion von Bim wird sowohl durch die Transkriptionsfaktoren FOXO3a und Runx3. als auch posttranskriptionell durch Phosphorylierung reguliert¹⁹¹. Die Kinase Ras/ERK (extrazelluläre Signalregulierende Kinase) wird über den IL-2-Rezeptor aktiviert, was zur Degradierung des Bim-Proteins und Destabilisierung der Bim-RNA führt¹⁹².

Fas und Fas-Ligand scheinen keine Rolle beim intrinisischen Zelltod zu haben, da ihr Fehlen zu keiner verminderten Todesrate nach Entzug von Zytokinen führt. Defekte im intrinsischen Zelltod durch dysfunktionelles Bim-Protein scheinen aber teilweise über den Fas-abhängigen extrinsischen Zelltod kompensiert zu werden, da Bim-defiziente Mäuse nur milde Autoimmunerkrankungen aufweisen. Somit können sich Fas und Bim gegenseitig kompensieren und regulieren so effizient die T-Zellhomöostase^{164,171}.



Abb. 3: Extrinsische und intrinsische Signalwege, die zur Apoptose führen¹⁶⁴.

1.7. Plasmazytoide Dendritische Zellen (pDCs)

Auf Grund ihrer starken Typ I Interferon-Produktion scheinen die pDCs eine wichtige Rolle in einer Vielzahl von viralen, nicht viralen und sogar autoimmunen Erkrankungen zu spielen¹⁹³.

Ein möglicher Einfluss der pDCs auf die PSC-Pathogenese wird spekuliert. Hierfür spricht, dass Genomweite Assoziationsstudien eine Assoziation zwischen PSC und Polymorphismen im plasmazytoiden Transkriptionsfaktor E2-2/Tcf4 feststellten³⁰.

DCs spielen eine wichtige Rolle in der angeborenen sowie der adaptiven Immunität. Sie erkennen Pathogene und initiieren adaptive Immunantworten¹⁹⁴. Sie werden unterteilt in die klassischen, myeloiden antigenpräsentierenden DCs (classical DC=cDCs) und die pDCs. Die cDCs sind spezialisiert auf die Aufnahme von Pathogenen, deren Prozessierung und anschließende Präsentation. Außerdem haben sie über die co-stimulierenden Moleküle CD80/CD86 die Fähigkeit, naive T-Zellen zu stimulieren¹⁹⁵. Sie sind bevorzugt in peripheren Geweben zu finden, von denen sie über die afferenten Lymphgefäße nach Pathogenaufnahme in T-Zellreiche lymphatische Organe wandern¹⁹⁶.

Bevorzugt befinden sich pDCs in den Lymphknoten, in die sie vom Blut über die hochendotheliale Venole (HEV) wandern¹⁹⁷. Obwohl sie nur in geringer Frequenz (0,2%-0,8%) im peripheren Blut vorliegen, stellen sie im Verlauf einer Virusinfektion 95% der von mononukleären Zellen im Blut produzierten Typ I Interferone (IFN-α/β) her¹⁹⁸. Durch ihre Interferon-Produktion rekrutieren und/oder aktivieren sie fast alle Zellen des Immunsystems, wie z.B. natürliche Killerzellen (NK-Zellen) oder Plasmazellen, so dass sie eine Schlüsselposition bei der Verbindung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem besitzen¹⁹³. Plasmazytoide DCs können anhand ihres spezifischen Oberflächenmarkers BDCA2 (CD303) und der Expression von CD4 und CD123 identifiziert werden^{199,200}. Sie exprimieren aber im Unterschied zu den cDCs nur geringe Mengen an MHCII und co-stimulierenden Molekülen¹⁹³. Als Zelllinien-spezifischer Marker wurde bei den pDCs der Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktor (E-Protein) E2-2/Tcf4 entdeckt²⁰¹, dessen Deletion in Mäusen zur spezifischen Inhibierung der pDC Entwicklung führt²⁰¹.

1.8. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, immunologische Mechanismen zu erforschen, die an der PSC-Pathogenese beteiligt sein könnten. Wir postulieren, dass bei Patienten mit PSC ein Ungleichgewicht zwischen Immunzellaktivierung und Immunzellregulierung vorliegt.

1) Untersuchung der Expression pro-inflammatorischer Zytokine im peripheren Blut von PSC-Patienten

In Vorarbeiten konnte bereits eine erhöhte periphere Th17-Antwort nach Pathogenstimulation in Patienten mit PSC detektiert werden. Zudem wies sowohl die häufig auftretende Keimbesiedlung der Gallengänge von PSC-Patienten als auch die Detektion bakterieller RNA in PSC-Lebern auf eine potentielle Rolle von Pathogenen und Th17-Zellen bei der PSC-Pathogenese hin⁵⁰. Genomweite Assoziationsstudien zur PSC bekräftigen diese Hypothese, da sie Assoziationen der PSC mit Polymorphismen Genloci aufzeigten, die für die Th17-Differenzierung und in für die Pathogenbeseitigung relevante Moleküle kodieren³⁵. Es sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob es bei PSC-Patienten im Vergleich zu Kontrollgruppen nach Pathogenstimulation peripherer mononukleären Zellen (PBMCs) zu einer verstärkten Produktion der pro-inflammatorischer Zytokine IL-1ß und IL-6 kommt. Dies könnte dazu führen, dass bei der PSC CD4+ T-Zellen prädisponiert sind, zu Th17-Zellen zu differenzieren.

Außerdem sollte untersucht werden, ob im peripheren Blut von PSC-Patienten im Vergleich zu Kontrollgruppen per se *ex vivo* vermehrt IL-17-produzierende Zellen vorliegen.

Auch die Rolle des pro-inflammatorischen Zytokins IFN γ bei der Pathogenese der PSC sollte durch Frequenzanalysen von IFN γ -produzierenden Zellen im peripheren Blut und durch Analysen der IFN γ -Sekretion von PBMCs bei PSC-Patienten und Vergleichsgruppen bestimmt werden. Zudem sollte im peripheren Blut durchflusszytometrisch die Frequenz IL-17/IFN γ co-produzierender Th17-Zellen untersucht werden, da sie in der Literatur als besonders pathogen beschrieben sind^{112,113}. Ferner sollte die Expression des pro-fibrotischen Zytokins IL-13 untersucht werden.

2) Charakterisierung der leukozytären Zellzusammensetzung im peripheren Blut von PSC-Patienten

Es sollte untersucht werden, ob es bei der PSC zu einer Dysbalance im Verhältnis der leukozytären Populationen im peripheren Blut kommt. Dies könnte auf einen potentiellen Einfluss dieser Zellen bei der PSC hindeuten. Hierfür sollte im Vollblut von PSC-Patienten und Kontrollgruppen eine vergleichende Frequenzanalyse der Neutrophilen, Monozyten, pDCs, DCs und Lymphozyten einschließlich lymphozytärer Unterpopulation wie z.B. der MAIT-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen erfolgen.

3) Charakterisierung regulatorischer Zellen und Moleküle im peripheren Blut von PSC-Patienten

Da unsere Arbeitsgruppe bei der PSC bereits eine reduzierte periphere Treg-Frequenz aufzeigen konnte⁴⁹, sollte nun die Frequenz weiterer regulatorischer Zellen wie der Tr1-Zellen in PSC-Patienten und Vergleichsgruppen untersucht werden. Um mögliche Mechanismen der von uns bereits im peripheren Blut detektierten verminderten in vitro suppressiven Treg-Kapazität von PSC-Patienten zu identifizieren, sollte bei **PSC-Patienten** und Kontrollgruppen sowohl eine Sekretionsanalyse des immunregulatorischen Zytokins IL-10 durch PBMCs als auch eine phänotypische Charakterisierung von Tregs erfolgen. Für die phänotypische Charakterisierung sollte im peripheren Blut die Frequenz von Tregs bzw. CD4+ Effektor-T-Zellen bestimmt werden, welche die immunregulatorischen Moleküle GARP, CTLA-4, PD-1 und Tim-3 exprimieren. Außerdem sollte die mittlere Expressionsstärke dieser Moleküle auf Tregs bzw. Effektor-T-Zellen analysiert werden.

4) Charakterisierung der Apoptosesensitivität von T-Zellen im peripheren Blut von PSC-Patienten

Auf Grund der Assoziation zwischen PSC und Polymorphismen im pro-apoptotischen Molekül Bim^{27,35} postulieren wir eine verminderte Apoptoserate von Effektor-T-Zellen als möglichen pathogenetischen Mechanismus der PSC. In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Apoptosesensitivität von T-Zellen nach Induktion vom RICD und CWID im peripheren Blut von PSC-Patienten und Vergleichsgruppen untersucht werden. Zusätzlich sollte durch Expressionsanalysen pro- bzw. anti-apoptotischer Moleküle bestimmt werden, welche Moleküle potentiell am apoptotischen Prozess des RICD oder CWID in T-Zellen beteilgt sein könnten. Hierfür sollte im peripherem Blut eine Untersuchung des Expressionsniveaus von Bim, Fas-Ligand, Bak und Bcl-2 in T-Zellen von PSC-Patienten und Kontrollgruppen nach Induktion von RICD oder CWID im Vergleich zu T-Zellen ohne Apoptoseinduktion erfolgen.

2. Material und Methoden

2.1 Laborgeräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Analytische Waage "Scout Pro"	Ohaus, Nänikon, Schweiz
Autoklav "VX-120"	Systec GmbH, Wettenberg
CO ₂ Inkubator "Sanyo"	Biomedica, München
Durchflusszytometer "LSR II"	BD Biosciences, Heidelberg
Eisbehälter "Magic Touch Icewear"	Bel-Art products, Wayne USA
ELISA-Auslesegerät "Opsys MRX TC II"	Dynex Technologies, Denkendorf
Flockeneismaschine "AF-10"	Scotsman Ice Systems, Frimont S.P.A., Italien
Gefrierschrank (-20°C) "Economic Froster Super"	Bosch, Stuttgart
Lichtmikroskop "Axiovert 40 CFL"	Carl Zeiss Microimaging, Jena
Kühlschrank (4°C)	Philipp Kirsch GmbH, Offenburg
Kühltruhe (-80°C) "Ultra Low"	Panasonic Biomedical Sales Europe B.V.,
	Etten Leur, Niederlande
Magnetrührer "MR 3001 K"	Heidolph Instruments, Schwabach
Magnetständer "MACS® MultiStand"	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Neubauer Zählkammer	Optik Labor Frischknecht, Balgach
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe, Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Real Time qPCR Analysegerät	Applied Biosystems by life technologies,
"StepOnePlus TM "	Darmstadt
Schüttelwasserbad "GFL 1083"	GFL - Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Schüttler und Heizblock "Thermomixer Comfort"	Eppendorf AG, Hamburg
Sicherheitswerkbank "Lamin Air"	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Spektrophotometer "Nanodrop 2000"	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Trennmagnet "QuadroMACS TM "	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Tisch-pH/Ionen Messgerät "Seven Compact™S220"	Carl Roth, Karlsruhe
Tischzentrifuge "Biofuge pico"	Heraeus Instruments, Osterode
Vortex "Reax 2000"	Heidolph Instruments, Schwabach
Thermocycler "MJ Research DNA Engine	GMI, Ramsey USA
Dyad"	
Zentrifuge "5417R"	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge "Megafuge 2.0"	Heraeus Instruments, Osterode

2.2 Verbrauchsmaterialien

Produktbezeichnung	Hersteller
Blutagarplatten	Carl Roth, Karlsruhe
Blutentnahmeröhrchen "S-Monovette® K-	Sarstedt, Nürnbrecht
EDTA"	
Filter "Steriflip" 0,22 µm	Merck, Darmstadt
Flüssigkeitsreservoirs	VWR, Darmstadt
LS-Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
McFarland-Standard-Gefäße	BD Biosciences, Heidelberg
Mikrotiterplatte "Maxisorp"	Nunc, Schwerte
Mikrotiterplatte für qPCR "MicroAmp® Fast	Applied Biosystems by life technologies,
Optical 96-well Reaction Plate"	Darmstadt
Multifly Kanülen (grün)	Sarstedt, Nürnbrecht
Nitril Schutzhandschuhe "Micro-Touch"	Ansell GmbH, München
Nylonsieb Cell Strainer 40 µm	BD Biosciences, Heidelberg
Nylonsieb Cell Strainer 100 µm	BD Biosciences, Heidelberg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2ml	Sarstedt, Nürnbrecht
Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Röhren, Flow Cytometry	Sarstedt, Nürnbrecht
Serologische Pipetten	Greiner bio-one, Grickenhausen
Sterilfilter "Filtropur V50"	Sarstedt, Nürnbrecht
Verschlussfilm "Rotilabo®"	Carl Roth, Karlsruhe
Zellkulturplatten Flachboden, Rundboden, 96-	Sarstedt, Nürnbrecht
well	

2.3 Humanes Vollblut

Das Blut von PSC-, PBC- und AIH-Patienten wurde in mehreren K-EDTA-Monovetten (Sarstedt) in der Leberambulanz der I. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf entnommen. Die PSC- und PBC-Diagnose erfolgte gemäß der EASL Leitlinie⁶. Als Kontrolle diente Vollblut von Gesunden. Die Verwendung der humanen Blutproben erfolgte mit Zustimmung der lokalen Ethikkommission.

Insgesamt wurde Blut von 97 verschiedenen PSC-Patienten verwendet. Hierbei waren akute bakterielle Cholangitiden und immunsuppressive Therapien mit mehr als 10 mg Prednisolon/Tag Ausschlusskriterien für die Experimente. Für die Stimulierung mit pathogenen Keimen wurde Blut von 28 PSC- und 20 PBC-Patienten und 25 gesunden Kontrollen verwendet. Die *ex vivo* Restimulierung von Vollblut mit PMA/Ionomycin erfolgte bei 19 PSC-, 12 PBC- und 6 AIH-Patienten sowie 19 Gesunden. Zusätzlich wurde Blut von 29 PSC- und 17 PBC-Patienten sowie 16 gesunden Kontrollen für die Untersuchung der Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine nach Stimulierung des T-Zellrezeptors mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 genutzt. Die Analyse der peripheren leukozytären Zellzusammensetzung

erfolgte in 37 PSC-, 18 PBC- und 13 AIH-Patienten sowie in 19 gesunden Personen. 32 Patienten mit PSC, 13 mit PBC, 8 mit AIH und 16 gesunde Kontrollen wurden bei der Bestimmung der peripheren Frequenz plasmazytoider DCs eingeschlossen. Die Bestimmung der Gesamtpopulation an DCs erfolgte mit 22 PSC-, 9 PBC- und 5 AIH-Patienten sowie 10 Gesunden. Die periphere MAIT-Frequenz wurde in 39 PSC-, 16 PBC-, 13 AIH-, 6 RA-(Rheumatoide Arthritis), 12 HCV-infizierten (Hepatitis C Virus) und 15 UC-Patienten sowie 21 Gesunden bestimmt. Die Bestimmung der Tr1-Frequenz fand in 30 PSC-, 9 PBC, 10 AIH-Patienten und 15 gesunden Kontrollpersonen statt und die Expression regulatorischer Moleküle wurde in 23 PSC- und 15 PBC-Patienten und 19 Gesunden durchgeführt. Zur Messung der Apoptosesensitivität wurde Vollblut von 34 Patienten mit PSC, 26 mit PBC und 34 Gesunden verwendet.

2.4 Chemikalien und Lösungen

Das Fetale Kälberserum (FCS) wurde vor der Verwendung zur Inaktivierung von Komplementfaktoren für 30 min bei 56°C erhitzt. Die für die Medien verwendeten Zusätze wurden steril filtriert (Porengröße $0,22 \,\mu$ m).

Produktbezeichnung	Hersteller		
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München		
Aqua ad iniectabila	Baxter, Unterschleißheim		
ABTS	Carl Roth, Karlsruhe		
Biocoll	Merck, Darmstadt		
Bovines Serumalbumin (BSA) "Fraction V"	PAA Laboratories, Pasching, Österreich		
Calciumchlorid (CaCl ₂) x 2H ₂ O	Merck, Darmstadt		
Chloroform "J.T. Baker® Stabilized"	VWR, Darmstadt		
Kompensationspartikel "CompBeads"	BD Pharmingen, Heidelberg		
Cytofix/Cytoperm TM	BD Pharmingen, Heidelberg		
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe		
DNase I	Roche, Mannheim		
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe		
70% Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe		
Erythrozytenlysepuffer "FACS Lysing	BD Pharmingen Heidelberg		
Solution"			
Fc-Rezeptor Bindungsinhibitor	eBioscience, Frankfurt		
Fetales Kälberserum	Invitrogen, Karlsruhe		
HEPES Pufferan®	Carl Roth, Karlsruhe		
Glykogen	Roche, Mannheim		
Golgi-Plug	BD Pharmingen, Heidelberg		

Ionomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencabonat (KHCO ₃)	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ x 6H ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ x 7H ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumacetat (NaCH ₃ COO)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe
Pacific Orange Succimidyl Ester (PacO-NHS)	Invitrogen, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Darmstadt
Perm/Wash	BD Pharmingen, Heidelberg
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, München
Proleukin (IL-2)	Novartis, Nürnberg
Purified Mouse Anti-Human CD3 (Klon:	BioLegend, Fell
OKT3)	
Purified Mouse Anti-Human CD3	BD Pharmingen, Heidelberg
Purified Mouse Anti-Human CD28	BioLegend, Fell
RPMI1640+Glutamax TM -I Kulturmedium	Gibco, Damstadt
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄) 2N Lösung	Carl Roth, Karlsruhe
TMB Plus ready-to-use Substrate	Kementec Diagnostics, Köln
TRIS Pufferan®	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X 100	Carl Roth, Karlsruhe
Trizol LS Reagenz	Ambion RNA by life technologies,
	Darmstadt
Trypanblau (0,4%)	Invitrogen, Darmstadt
Tween® 20	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid 30% (H ₂ O ₂)	Merck, Millipore, Darmstadt

2.5 Kits

Produktbezeichnung	Hersteller
cDNA-Synthese Kit "High-Capacity"	Life Technologies, Darmstadt
Foxp3 Staining Buffer Kit, human	BD Pharmingen, Heidelberg
Human IFNy ELISA Development Kit	PeproTech GmbH, Hamburg
Human IL-1 β DuoSet ELISA Development	R&D Systems, Wiesbaden
System	
Human IL-6 ELISA Development Kit	PeproTech GmbH, Hamburg
Human IL-10 ELISA Development Kit	PeproTech GmbH, Hamburg
Human IL-13 ELISA Development Kit	PeproTech GmbH, Hamburg
Human IL-17 ELISA Development Kit	PeproTech GmbH, Hamburg
NucleoSpin® RNA/Protein	Machery Nagel, Düren
Pan T Cell Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Pharmingen, Heidelberg
RNA-Isolationskit "Triprep"	Macherey-Nagel, Düren
Reaktionslösung "Probe Fast" für qPCR Analysegerät "StepOnePlus TM "	Kapa Biosystems, Inc., Wilmington, USA

2.6 Referenzkeime

Produktbezeichnung	Hersteller
Candida albicans (ATCC24433)	LGC Standards, Wesel
Enterococcus faecalis (ATCC29212)	LGC Standards, Wesel
Escherichia coli (ATCC25922)	LGC Standards, Wesel
Staphylococcus aureus (ATCC25923)	LGC Standards, Wesel

2.7 Antikörper (AK) für die Durchflusszytometrie

Antikörperbezeichnung	Klon	Hersteller
CD3 Alexa Fluor 700	UCHT1	BioLegend, Fell
CD4 Pacific Blue	RPA-T4	BioLegend, Fell
CD8 PE-Cy7	RPA-T8	BioLegend, Fell
CD8 Alexa Fluor 700	RPA-T8	BioLegend, Fell
CD14 Alexa Fluor 488	M5E2	BD Pharmigen, Heidelberg
CD16 APC-Cy7	3G8	BioLegend, Fell
CD25 PE-Cy7	2A3	BioLegend, Fell
CD25 PE	2A3	BioLegend, Fell
CD45 V500	HI30	BD Pharmingen, Heidelberg
CD45RA Alexa Fluor 700	HI100	BioLegend, Fell
CD56 APC	CMSSB	eBioscience, Frankfurt
CD123 PE	6H6	BioLegend, Fell
CD127 (IL-7RA) PE	A019D5	BioLegend, Fell
CD127 (IL-7RA) Alexa Fluor 647	A019D5	BioLegend, Fell
CD161 PE	HP-3G10	BioLegend, Fell
CD195 (CCR5) Alexa Fluor 647	HEK/1/85a	BioLegend, Fell
CD196 (CCR6) Alexa Fluor 488	G034E3	BioLegend, Fell
CD303 APC	201A	BioLegend, Fell
CTLA-4 (CD151) PE	L3D10	BioLegend, Fell
Foxp3 Alexa Fluor 488	259D	BioLegend, Fell
GARP APC	7B11	BioLegend, Fell
HLA DR Alexa Fluor 700	L243	BioLegend, Fell
IFNγ APC/Cy7	4S.B3	BioLegend, Fell
IL-17 Alexa Fluor 488	N49-653	BD Pharmingen, Heidelberg
Lineage Cocktail (CD3/14/16/19/20/56)		BioLegend, Fell
PD-1 (CD279) PerCP/Cy5.5	EH12.2H7	BioLegend, Fell
ΤСRγδ ΡΕ	11F2	BD Pharmingen, Heidelberg
Tim3 PE	F38-2E2	BioLegend, Fell
Vα7.2 FITC	3C10	BioLegend, Fell

2.8 Puffer

BSA-Puffer	1x PBS
	2% BSA
1x PBS, pH 7,4	KCl 2,7 mM
	KH ₂ PO4 1,5 mM
	NaCL 137 mM
	Na ₂ HPO4 6,5 mM
MACS-Puffer	1x PBS
	0,5% BSA
	2.5 mM EDTA

2.9 Primer für die Polymerase-Kettenreaktion

Primer für die quantitative Polymerase-Kettenreaktion

TaqMan®Gene Expression Assays	Sondennummer
(Applied Biosystems by life technologies,	
Darmstadt)	
BCL2L11 (BIM)	Hs00708019-s1
BCL2	Hs00608023-m1
BAK1	Hs00832876-g1
FASLG (FAS Ligand)	Hs00181225-m1
GAPDH	Hs03929097-g1

2.10 Software

Produktbezeichnung	Hersteller
FACS Diva6	BD Pharmingen, Heidelberg
GraphPad Prism®	GraphPad Software, Inc., San Diego, USA
StepOnePlus TM Software V2.1.	Applied Biosystems by life technologies,
	Darmstadt

2.11 Zellbiologische Methoden

2.11.1 Bestimmung der Zellzahl

Um die Anzahl vitaler Zellen zu ermitteln, wurde die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. Hierfür wurde die Zellsuspension in einer entsprechenden Verdünnung mit Trypanblau angefärbt. Dieser Farbstoff wird durch die Plasmamembran lebender Zellen energieabhängig ein- und wieder ausgeschleust. Da dies bei toten Zellen nicht der Fall ist, kommt es zur intensiven Blaufärbung des Zytoplasmas. Somit kann man zusätzlich zur Zellzahlbestimmung Aussagen über die Zellvitalität treffen. Je 10 µl der mit Trypanblau verdünnten Zellsuspension wurden in die Neubauer Zählkammer eingebracht und die Zellkonzentration je Milliliter Lösung wie folgt berechnet:

Zellzahl x Verdünnungsfaktor x Kammerkonstante 10⁴.

2.11.2 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMCs)

PBMCs wurden mittels einer Dichtegradientenzentrifugation aus Vollblut isoliert. Während der Zentrifugation können PBMCs und Thrombozyten auf Grund ihrer Dichte eine Schicht aus dem synthetischen Polysaccharid Biocoll (Dichte: 1,077 g/ml) nicht passieren, im Gegensatz zu Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen. Die PBMCs, welche sich aus Lymphozyten und Monozyten zusammensetzen, befanden sich nach Zentrifugation in einer Intermediärschicht.

Als Ausgangsmaterial dienten pro Patient ca. 25 ml Vollblut, von dem nach Zentrifugation (5 min, Raumtemperatur (RT), 430 x g) das Blutplasma verworfen wurde. Die Sedimente wurden in einem 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt und mit PBS auf 35 ml aufgefüllt. Diese Blutzellsuspension wurde anschließend auf 15 ml einer auf RT erwärmten Biocolllösung geschichtet und für 20 min bei 600 x g und ohne Bremse zentrifugiert (RT). Die mit PBMCs angereicherte Intermediärschicht wurde abgenommen und zweimal mit je 10 ml PBS gewaschen (5 min, RT, 430 x g). Der Überstand wurde jeweils dekantiert und das Zellpellet anschließend in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert und bis zur weiteren Behandlung bei 4°C gelagert.

2.11.3 Herstellung von hitzeinaktivierten Keimen

Kulturen von *Candida albicans, Escherichia coli, Enterococcus faecalis* und *Staphylococcus aureus* wurden über Nacht auf Blutagarplatten gezogen. Anschließend wurden die Kulturen in ein McFarland-Standard-Gefäß (0,85% NaCl) gegeben und auf einen McFarland-Standard von 3,3 eingestellt, so dass die Konzentration 10⁸/ml betrug. Die Keimlösung wurde nun zu je 1 ml

in Eppis verteilt, in einem Thermocycler für 40 min hitzeinaktiviert (80° C, 600 rpm) und danach zentrifugiert (5 min, RT, 12400 x g). Der Überstand wurde dekantiert und das Keimpellet mit je 1 ml PBS resuspendiert. Die hitzeinaktivierten Keime konnten nun bei - 80° C bis zu ihrem weiteren Gebrauch gelagert werden. Als Sterilkontrolle wurden die hitzeinaktivierten Keime im Brutschrank über Nacht auf einer Blutagarplatte kultiviert.

2.11.4 Stimulierung von PBMCs mit hitzeinaktivierten Keimen

Die PBMCs wurden in einer Konzentration von 3 x 10^5 Zellen/well in einem Volumen von 200 µl RPMI-Kulturmedium (2% FCS, 1% P/S) in 96-well Rundbodenzellkulturplatten ausgesät. Die Stimulierung erfolgte mit hitzeinaktivierten Bakterien bzw. Pilzen in einer Konzentration von 10^8 Keimen/ml. Anschließend wurden die stimulierten Zellen bei 37°C und 5% CO₂ im Zellinkubator kultiviert. Die Abnahme der Zellkulturüberstände für die Bestimmung der Zytokinkonzentration erfolgte nach 24 h durch Abnahme von je 100 µl/well, welche anschließend bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert wurden.

2.11.5 Stimulierung von Zellen für die Zytokinbestimmung im Zellkulturüberstand

Für die Stimulierung von T-Zellen über ihren T-Zellrezeptor wurden PBMCs isoliert (s. 2.11.2) und auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in RPMI-Zellkulturmedium (5% FCS, 1% P/S) eingestellt. In 96-well Rundbodenzellkulturplatten wurden je 50 µl AK/well in PBS verdünnter anti-CD3 Antikörper (1µg/ml) ausgesät und mindestens 1 h bei 37% und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde ungebundener anti-CD3 Antikörper durch Waschen mit PBS aus den wells der Zellkulturplatte entfernt und die Zellsuspension zu je 200 µl/well in diese hineingegeben und mit anti-CD28 Antikörper (1µg/ml) co-stimuliert. Die Zellen wurden bei 37% und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellkulturüberstände wurden zu je 150 µl/well nach 96 h abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.11.6 Stimulierung von PBMCs für die Analyse der Oberflächenexpression regulatorischer Moleküle

Die PBMCs wurden auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in RPMI-Zellkulturmedium (5% FCS, 1% P/S) eingestellt. Anschließend wurden die Zellsuspension zu je 200 µl/well in eine 96-well Rundbodenzellkulturplatte ausgesät und mit 100 U/ml IL-2 stimuliert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte über 72 h bei 37% und 5% CO₂. Die Zellen wurden danach für die weitere durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker und des
Transkriptionsfaktors Foxp3 in 5 ml Röhrchen überführt und mit PBS/2% BSA gewaschen (5 min, 4°C, 430 x g).

2.12 Immunologische Methoden

2.12.1 Zytokinbestimmung im Zellkulturüberstand mittels ELISA

Die Konzentration der Zytokine im Zellkulturüberstand wurde mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) detektiert. Hierbei wurden zwei Antikörper benutzt, die spezifisch das gleiche Molekül im Zellkulturüberstand erkennen, aber an unterschiedliche Epitope binden. Durch den ersten Antikörper wird das Zytokin an eine Mikrotiterplatte gebunden und anschließend zusammen mit einem biotinylierten Zweitantikörper inkubiert. An diesen Zweitantikörper bindet anschließend eine Streptavidin-gekoppelte Meerrettich-Peroxidase, die durch Umsetzung ihres Substrats für einen Farbumschlag sorgt, der photometrisch detektiert werden kann. Um die gemessene optische Dichte (OD) in eine Proteinkonzentration umrechnen zu können, wurde bei jeder Messung ein Standard mitgeführt. Als Substrat der Peroxidase wurde bei der Detektion von IL-1 β Tetramethylbenzidin (TMB, fertige Gebrauchslösung) eingesetzt. Bei der Konzentrationsbestimmung von IFN γ , IL-17, IL-6, IL-10 und IL-13 wurde Diammonium-2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure (ABTS) verwendet. Alle Konzentrationsbestimmungen erfolgten nach Herstellerprotokoll.

2.12.2 Isolierung von CD4+ und CD8+ T-Zellen aus PBMCs

Die **PBMCs** wurden in 2.11.2 beschrieben Vollblut wie aus mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Um T-Zellen zu isolieren, wurden die Zellen mittels Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) sortiert. Hierfür wurden die Zellen mit PBS unter Standardbedingungen gewaschen (5 min, RT, 430 x g) und das Zellpellet in MACS-Puffer resuspendiert (40 μ l/1x10⁷ Zellen). Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 4°C mit einem biotinylierten Antikörpercocktail (10 µl/1x10⁷ Zellen) inkubiert, der aus Antikörpern gegen CD14, CD15, CD16, CD19, CD34, CD36, CD56, CD123 und CD235a (Glykophorin a) bestand. Somit waren nur die T-Zellen nicht an Antikörper gebunden, während Monozyten, Dendritische Zellen, Neutrophile, B-Zellen, Eosinophile, Granulozyten und Erythrozyten an Antikörper gekoppelt vorlagen. Anschließend wurde weiterer MACS-Puffer zur Zellsuspension gegeben ($30 \mu l/1x 10^7$ Zellen) und die Zellen mit anti-Biotin Magnetbeads ($20 \mu l/1x 10^7$ Zellen) inkubiert (10 min, 4°C). In einem Magnetständer wurde eine LS-Säule gespannt und mit 3 ml gekühltem MACS-Puffer äquilibriert. Die Zellsuspension wurde auf ein Volumen von je 500 µl aufgefüllt und auf die Säule gegeben. Alle Zellen, an denen der Erstantikörper gebunden hatte, wurden in der Säule zurückgehalten, während die T-Zellen die Säule passieren konnten und sich im Durchfluss befanden. Die T-Zellen wurden anschließend unter Standardbedingungen gewaschen, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen. Die Reinheit der so gewonnenen CD4+ und CD8+ T-Zellen betrug 90-95% und wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

2.12.3 Durchflusszytometrie/Fluoreszenz Activated Cell Sorting (FACS)

Bei der Durchflusszytometrie kann eine große Zahl von Zellen analysiert werden, die mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern oder fluoreszierenden Molekülen angefärbt wurden. Bei dieser Technik können verschiedenen Eigenschaften der Zellen untersucht werden, während diese Zellen hintereinander eine dünne Messkammer durchfließen und von der Seite von einem Laser definierter Wellenlänge angestrahlt werden. Photodetektoren messen dabei die Lichtstreuung der Fluoreszenzfarbstoffe, die ein Maß für die Größe und Granularität der Zellen ist und deren Emission. Es kann sowohl der Anteil exprimierender Zellen einer Population als auch die relative Expression einer einzelnen Zelle bestimmt werden.

Um die Fluoreszenzkanäle am verwendeten Durchflusszytometer (FACS LSR II) zu kompensieren, wurden Einzelfärbungen der verwendeten Fluorochrome mit Kompensationspartikeln durchgeführt. Außerdem wurden ungefärbte Zellen eingelesen, so dass die Autofluoreszenz der Zellen berücksichtigt wurde. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper auszuschließen, wurde für jeden verwendeten Antikörper auch eine Isotypkontrolle mitgefärbt. Von der Analyse der Zellen wurden tote Zellen und Dubletten ausgeschlossen. Die Messungen wurden mit der FACS Diva6 Software ausgewertet.

2.12.3.1 Expressionsanalyse von Oberflächenmarkern mittels FACS-Analyse

Zur Expressionsanalyse von Oberflächenmarkern wurden die Zellen in 5 ml Reaktionsgefäße überführt ($1x10^{6}$ Zellen/Röhrchen) und mit PBS/2% BSA gewaschen (5 min, 4°C, 430 x g). Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 100 µl PBS/2% BSA mit 1-10 µl AK/Probe im Dunkeln gefärbt (20 min, 4°C). Die ungebundenen Antikörper wurden anschließend durch Waschen entfernt und das Zellpellet zur Fixierung in 4% PFA aufgenommen (15 min, 4°C).

Zur Expressionsanalyse von Zellen im Vollblut wurden je 50 μ l Vollblut mit je 50 μ l PBS/2% BSA verdünnt und mit 1-10 μ l Antikörper/Probe gefärbt. Die Erythrozytenlyse erfolgte anschließend direkt durch Zugabe von je 1 ml "FACS Lysing Solution" (1:10 mit deionisiertem H₂0 verdünnt) zur Vollblutsuspension. Nach einer Inkubation im Dunkeln (15 min, RT) waren die Erythrozyten lysiert und die restlichen Zellen fixiert.

Nach einem Waschschritt wurden die Zellen für die durchflusszytometrische Analyse in 300 µl PBS aufgenommen und bis zur weiteren Analyse bei 4°C im Dunkeln gelagert oder intrazellulär gefärbt.

2.12.3.2 Vitalitätstest von Zellen für die durchflusszytometrische Analyse

Zur Detektion toter Zellen wurden die Zellen während der Oberflächenfärbung zeitgleich mit Pacific Orange Succimidyl Ester (PacO-NHS) gefärbt. Hierbei handelt es sich um einen Farbstoff, der in tote Zellen eindringt und an freie Amine im Inneren der Zelle binden kann. Intakte Zellen bleiben ungefärbt, so dass diese von den Toten abgegrenzt werden können. Zur Färbung toter Zellen wurde die Oberflächenantikörperfärbung wie in 2.12.3.1 beschrieben durchgeführt, wobei gleichzeitig auch PacO-NHS zur Antikörpersuspension in einer Verdünnung von 1:1000 hinzugegeben wurde. Die Inkubation erfolgte für 20 min bei 4°C im Dunkeln. Die Zellen wurden anschließend gewaschen, bevor sie in 4% PFA fixiert (15 min, 4°C) oder weiter intrazellulär angefärbt wurden.

2.12.3.3 Intrazelluläre Antikörperanfärbung von Zytokinen für die FACS-Analyse Zur intrazellulären Antikörperanfärbung wurden die Zellen, deren Oberfläche bereits gefärbt vorlag, fixiert und permeabilisiert. Hierfür wurden die Zellen gewaschen, das Zellpellet anschließend in 250 µl Cytofix/Cytoperm aufgenommen und bei Dunkelheit inkubiert (20 min, 4°C). Cytofix/Cytoperm enthält Saponin, welches die Zellmembran permeabilisiert, so dass Antikörper in die Zelle eindringen und intrazelluläre Proteine anfärben können. Als weiterer Bestandteil sorgt Monensin für die Inhibition des Proteintransports des Golgi-Apparats zur Zellmembran. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit je 1 ml Saponin-haltigen Perm/Wash-Puffer gewaschen, so dass die Poren in der Zellmembran aufrechterhalten blieben. Der Perm/Wash-Puffer wurde nach Herstellerangaben 1:10 mit deionisiertem H₂O verdünnt. Nach Dekantierung des Überstands wurde das Zellpellet in 50 µl Perm/Wash-Puffer resuspendiert und mit je 1-10 µl AK/Probe gefärbt (30 min, 4°C). Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen noch zweimal mit Perm/Wash-Puffer gewaschen, bevor sie in 300 µl PBS aufgenommen und bis zur FACS-Analyse bei 4°C im Dunkeln gelagert wurden.

2.12.3.4 Intrazelluläre Anfärbung von Transkriptionsfaktoren (Foxp3)

Um intrazellulär den Transkriptionsfaktor Foxp3 anzufärben, wurde das Foxp3 Pufferset nach Herstellerangaben verwendet. Hierfür wurden die Zellen nach der Oberflächenfärbung, die wie in 2.12.3.1 beschrieben erfolgte, in 2 ml/Röhrchen FoxP3 Puffer A (1:10 mit deionisiertem H₂O verdünnt) resuspendiert und für 10 min bei RT im Dunkeln fixiert. Die Zellen wurden hiernach mit je 1 ml PBS/2% BSA gewaschen und danach für die Permeabilisierung je 500 µl Foxp3 Puffer C hinzugefügt (1:50 in Foxp3 Puffer A verdünnt). Nach einer Inkubation von 30 min bei RT im Dunkeln wurden die Zellen zweimal gewaschen. Anschließend erfolgte die intrazelluläre Anfärbung des Transkriptionsfaktors mit je 5 µl des anti-Foxp3 Antikörpers in 100 µl PBS/2% BSA für 30 min bei RT im Dunkeln. Nach zweimaligem Waschen der Zellen wurde das Zellpellet in je 300 µl PBS resuspendiert und bis zur FACS-Analyse bei 4°C im Dunkeln gelagert.

2.12.4 Restimulierung von Zellen mit PMA/Ionomycin

Um PBMCs mit PMA/Ionomycin zu stimulieren, wurden diese in einer Konzentration von $3x10^6$ Zellen/ml in RPMI-Zellkulturmedium (5% FCS, 1% P/S) aufgenommen, welches 5 ng/ml PMA, 1 µg/ml Ionomycin und 1 µg/ml Golgi-Plug enthielt. Hierbei unterband Golgi-Plug den Proteintransport vom Golgi-Apparat zur Zellmembran. Die Zellen wurden zu je 200 µl/well in eine 96-well Rundbodenzellkulturplatte ausgesät und über 4 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend konnten die Oberflächenmarker, die toten Zellen und intrazellulär produzierte Zytokine für die Durchflusszytometrie, wie in 2.12.3 beschrieben, angefärbt und analysiert werden.

Für die *ex vivo* Stimulation von Vollblut wurde dieses 1:1 mit RPMI-Zellkulturmedium (1% P/S) vermischt und mit 25 ng/ml PMA, 5 μ g/ml Ionomycin und 1 μ g/ml Golgi-Plug versetzt. Die Blutsuspension wurde zu je 200 μ l/well in eine 96/well Rundbodenzellkulturplatte ausgesät und über 4h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Im Anschluss wurde das Blutgemisch in 5 ml Röhrchen überführt und die Oberflächenmarker zeitgleich mit den toten Zellen angefärbt (20 min, 4°C). Im Anschluss erfolgte eine Erythrozytenlyse mit gleichzeitiger Fixierung der übrigen Zellen (s. 2.12.3.1). Die Zellen konnten nun wie üblich intrazellulär angefärbt werden (s. 2.12.3.3).

2.12.5 Messung der Apoptosesensitivität von T-Zellen

Zur Analyse der Apoptosesensitivität von CD4+ und CD8+ T-Zellen, wurden diese wie in 2.12.2 beschrieben isoliert und die T-Zellen über ihren T-Zellrezeptor stimuliert. Hierfür wurden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in RPMI-Zellkulturmedium (5% FCS, 1% P/S) resuspendiert. Je 200 µl/well der Zellsuspension wurden zusammen mit einem co-stimulierenden anti-CD28 Antikörper (1 µg/ml) in eine 96-well Rundbodenzellkulturplatte gegeben. Diese war zuvor mit je 50 µl/well eines T-Zellrezeptor-

stimulierenden anti-CD3 Antikörpers (1 µg/ml in PBS verdünnt) befüllt worden, welcher für mindestens 1 h bei 37% und 5% CO₂ inkubierte. Ungebundener anti-CD3 Antikörper wurde durch Waschen mit PBS aus den wells der Mikrotiterplatte entfernt. Die T-Zellstimulierung erfolgte über 72 h bei 37°C und 5% CO₂. Anschließend wurden die so aktivierten T-Zellen in 15 ml Reaktionsröhrchen geerntet und dreimal mit je 10 ml PBS unter Standardbedingungen gewaschen. Die Überstände wurden nach jedem Waschschritt verworfen und das Zellpellet in einer Konzentration von 1x10⁶ Zellen/ml in RPMI-Zellkulturmedium (5% FCS, 1% P/S) zu je 200 µl/well in eine 96- well Mikrotiterplatte ausgesät. Das Zellkulturmedium wurde mit 100 U/ml IL-2 supplementiert. Nach 7 Tagen Kultivierung bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen in ein 15 ml Reaktionsröhrchen geerntet und dreimal mit je 10 ml PBS gewaschen, bevor die Zellen in RPMI-Zellkulturmedium (5% FCS, 1% P/S) auf eine Konzentration von 1x10⁶ Zellen/ml eingestellt wurden. Anschließend erfolgte die Apoptoseinduktion auf zwei unterschiedliche Arten, während zeitgleich T-Zellen ohne Apoptoseinduktion (200 µl/well) in Zellkulturmedium (5% FCS, 1% P/S, supplementiert mit 100 U/ml IL-2) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert wurden.

Restimulierungs-induzierter Zelltod (RICD):

Für die Induktion der Apoptose durch Restimulierung bereits aktivierter T-Zellen wurden die Zellen in 5% FCS-haltigem Zellkulturmedium (supplementiert mit 100 U/ml IL-2) zusammmen mit geringen Konzentrationen eines löslichen anti-CD3 Antikörpers (Klon: OKT3, 100 ng/ml) in eine 96-well Rundbodenzellkulturplatte (200 µl/well) ausplattiert.

Zytokinentzug-induzierter Zelltod (CWID):

Die Apoptose durch Entzug vom Zytokin IL-2 wurde induziert, indem die T-Zellen in 5% FCS-haltigem RPMI-Zellkulturmedium ohne Zusätze von Interleukinen in einer 96-well Mikrotiterplatte (200 μ /well) kultiviert wurden.

Die Inkubation für den RICD und den CWID erfolgte über 6 h (Expressionsanalyse via qRT-PCR) bzw. 24 h (FACS-Analyse) bei 37°C und 5% CO₂.

Nach 6 h wurde ein Teil der T-Zellen für die Expressionsanalyse pro- bzw. anti-apoptotischer Moleküle in ein 15 ml Röhrchen geerntet und unter Standardbedingung gewaschen. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 700 µl Trizol LS aufgenommen, was zur Zelllyse führte. Die Trizol-Zellsuspension wurde nun bei -80°C bis zur anschließenden RNA-Extraktion gelagert. Nach 24 h wurden die restlichen T-Zellen für die durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptosesensitivität geerntet und in 5 ml Röhrchen überführt. Hierbei erfolgte die Oberflächenfärbung der T-Zellmarker CD4 und CD8 wie in 2.12.3.1 beschrieben. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in je 100 µl Annexin V Bindungspuffer (1:10 mit deionisiertem H₂O verdünnt) resuspendiert. Durch Zugabe von je 5 µl Annexin V wurde das Phospholipid Phosphatidylserin für 15 min bei RT im Dunkeln angefärbt. Phosphatidylserin befindet sich bei intakten Zellen auf der Innenseite der Plasmamembran und transloziert schon während der frühen Phase der Apoptose auf die Außenseite, so dass es vom Phospholipid-Bindungsprotein Annexin V gebunden werden kann. Der Gebrauch von Annexin V ermöglichte die Apoptosedetektion vom frühen Stadium der Apoptose bis hin zum Zelltod. Die Färbung wurde durch Zugabe von je 400 µl Annexin V Bindungspuffer gestoppt und die Zellen wurden direkt durchflusszytometrisch analysiert. Der Zelltod wurde als prozentualer Zellverlust quantifiziert, wobei T-Zellen ohne Apoptoseinduktion als Vergleichsgruppe dienten.

Prozentualer Zellverlust = $(1 - (\frac{\text{Anzahl lebender Zellen (Apoptoseinduktion)}}{\text{Anzahl lebender Zellen (ohne Apoptoseinduktion)}})) x100$

2.13 Molekularbiologische Methoden

2.13.1 RNA-Isolierung aus T-Zellen

Zur Extraktion der RNA aus T-Zellen wurden diese mit je 700 µl Trizol LS lysiert. Nach Zugabe von je 1 µl Glykogen und 200 µl Chloroform wurde die Zellsuspension gemischt, so dass eine optimale Phasendurchmischung erzielt wurde. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde die Suspension zentrifugiert (15 min, 4°C, 12000 x g), so dass drei Phasen entstanden. Die untere Phenolphase enthielt Zellreste und Proteine, die Interphase genomische DNA und die obere wässrige Phase RNA. Die RNA-Phase wurde nun in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 25 µl 3M Natriumacetatlösung (pH 5,2) und 175 µl Isopropanol bei -20°C über Nacht gefällt. Anschließend wurde die Lösung zentrifugiert (30 min, 4°C, 12000 x g) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde nun mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen (15 min, 4°C, 12000 x g), der Überstand verworfen und das Pellet für 30 min unter dem Abzug getrocknet. Der DNase-Verdau erfolgte durch Zugabe von je 100 µl des DNase-Mastermixes aus dem NucleoSpin® TriPrep Kit zur RNA-Lösung. Nach anschließender Inkubation bei 37°C (10 min) wurde wiederum die RNA mit 10 µl 3M Natriumacatatlösung und 70 µl Isopropanol über Nacht bei -20°C gefällt. Die Suspension wurde nochmals zentrifugiert (15 min, 4°C, 12000 x g) und mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen (15 min, 4°C, 12000 x g). Nachdem das RNA-Pellet unter dem Abzug getrocknet wurde (30 min), wurde es in 30 μ l RNase freiem H₂O aufgenommen und für 5 min bei 50°C inkubiert. Das Pellet wurde nun vorsichtig resuspendiert und die Konzentration mit dem Spektrophotometer bestimmt.

2.13.2 cDNA-Synthese

Die Umschreibung von RNA in cDNA erfolgte mit Hilfe des "High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits" nach Herstellerangaben. Es wurde je 1 µg RNA eingesetzt.

2.13.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglichte die spezifische Amplifikation von DNA-Fragmenten und wurde eingesetzt um mittels quantitativer Real Time-PCR die Expression pro- und anti-apoptotischer Proteine zu bestimmen, deren RNA zuvor in cDNA umgeschrieben wurde (s. 2.13.2).

2.13.3.1 Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR)

Die Bestimmung der Expression von Molekülen, die relevant in den Prozess der Apoptose involviert sind, erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe der in 2.9 aufgeführten "TaqMan® Gene Expression Assays". In ihnen ist ein ungelabeltes Primerpaar enthalten, welches der Amplifikation der entsprechenden cDNA dient. Außerdem enthalten sie eine sequenzspezifische Sonde, welche an den Quencher MGB (minor groove binder) und dem Fluorophor FAM (6-Carboxylfluorescein) gebunden ist. Nach Bindung der Sonde an ihre komplementäre Zielsequenz wird das Fluorophor freigesetzt und die Detektion des so entstandenen Fluoreszenzsignals dient dann der Quantifizierung des Amplifikats. Für die qRT-PCR wurde pro well der unten angeführte Reaktionsansatz in eine 96-well Mikrotiterplatte gegeben. Die Amplifikation erfolgte im "Fast Plates Run" in einem StepOnePlusTM System.

Reaktionsansatz/well für die aRT-PCR

iteritionsumbuter wen fut uite qitti i ett	
cDNA	4,3 μ
"TaqMan® Gene Expression Assays", Applied Biosystems	0,5 µl
"Probe Fast qPCR MasterMix Universal", Kapa Biosystems	5 µl
"ROX Reference Dye High", Kapa Biosystems	0,2 µl

Fast Plate Run

Initiale Denat	95°C 0:20 min	
40 x Zyklen:	Denaturierung:	95°C 0:01 min
	Annealing/Elongation:	60°C 0:20 min

Die Analyse der Daten erfolgte mittels der StepOnePlusTM Software V2.1. Als Haushaltsgen wurde GAPDH verwendet, welches zur relativen Quantifizierung diente (Δ ct, ct= cycle threshold). Die Linearisierung der Werte erfolgte mit Hilfe der Formel: ½^ Δ ct. Zur Berechnung der n-fachen Expression behandelter Proben zu unbehandelten Proben (Kontrollen) wurde der Wert der Kontrollgruppe gleich eins gesetzt und die übrigen Werte hierauf normalisiert.

2.14 Statistische Analysen

Für die graphische und statistische Auswertung wurde die Software GraphPad Prism® genutzt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte angegeben und graphisch als Mediane dargestellt. Die Signifikanz wurde beim direkten Vergleich von zwei Gruppen mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test berechnet. Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde die Signifikanz mittels one-way ANOVA und dem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test zwischen allen verwendeten Patientenkohorten getestet, wobei alle Ergebnisse mit einem p-Wert<0,05 als statistisch signifikant betrachtet wurden ($p \le 0,05$:*, $p \le 0,01$:***, $p \le 0,001$:****).

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs

Die klinischen Charakteristika der Patienten sind in **Tabelle 2** angegeben. 49 PSC-Patienten (50%) hatten ein assoziiertes Colitis Ulcerosa ähnliches Krankheitsbild, während 12 PSC-Patienten (12%) an Morbus Crohn litten. In 36 PSC-Patienten (37%) konnten chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) mittels Koloskopie ausgeschlossen werden. 90 PSC-(93%) und 70 PBC-Patienten (90%) wurden mit Ursodesoxycholsäure (UDCA) in einer medianen Dosis von 15 mg/kg Körpergewicht (PSC) bzw. 13,7 mg/kg Körpergewicht (PBC) therapiert. 20 PSC-Patienten (20%) befanden sich zusätzlich unter immunsuppressiver Therapie. Diese bestand in der Gabe von Azathioprin (mediane Dosis von 75 mg/Tag) oder Prednisolon (mediane Dosis von 5 mg/Tag).

Diagnosegruppe	Alter	Geschlecht	ALT	AP	Bilirubin	CED	UDCA/
	(Jahren)	(m/w)	(IU/l)	(IU/l)	gesamt	(UC/	Immunsuppressive
					(mg/dl)	MC)	Therapie
PSC (n=97)	43	64/33	46	146	0,8	49/12	90/20
	(18-76)		(11-603)	(24-984)	(0,2-32)		
PBC (n=77)	60	5/72	27	119	0,4	3/0	70/10
	(40-83)		(9-90)	(35-327)	(0,2-2,1)		
AIH (n=25)	59	6/19	26	70	0,7	-	0/22
	(23-78)		(11-719)	(30-169)	(0,3-10,7)		
UC (n=15)	46	9/6	19	64	0,4	15/0	0/12
	(27-68)		(12-51)	(42-128)	(0,2-1,1)		
HCV (n= 12)	50	10/2	47	84	0,6	-	-
	(38-72)		(14-312)	(45-154)	(0,2-0,9)		
RA (n=6)	37	1/5	19	60	-	-	0/5
	(32-79)		(8-54)	(43-84)			
Gesund (n=64)	28	19/45	-	-	-	-	-
	(19-52)						

Tab. 2: Klinische Charakteristika des Patientenkollektivs

HCV= Hepatitis C Virusinfektion; RA= Rheumatoide Arthritis: ALT= Alaninaminotransferase; AP= alkalische Phosphatase; CED= chronisch entzündliche Darmerkrankung; UC= Colitis Ulcerosa; MC= Morbus Crohn; UDCA= Ursodesoxycholsäure.

Normbereich: ALT<35 IU/l; AP<104 IU/l; Gesamtbilirubin<1,2 mg/dl. Es sind die Mediane und die Datenbereiche angegeben.

3.2 Untersuchung der Expression pro-inflammatorischer Zytokine im peripheren Blut von PSC-Patienten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Expression pro-inflammatorischer Zytokine bei Patienten mit PSC untersucht. Hierbei erfolgte die Analyse im peripheren Blut sowohl nach Pathogenstimulation als auch nach Stimulierung mit PMA/Ionomycin und Stimulierung des T-Zellrezeptors mit Antikörpern gegen CD3 und CD28.

3.2.1 Verstärkte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine durch PBMCs von PSC-Patienten nach Stimulation mit pathogenen Keimen

Th17-Zellen könnten entscheidend an der Induktion der PSC beteiligt sein, da sie eine wichtige Rolle bei der Abwehr extrazellulärer Pathogene spielen und dabei Autoimmunität induzieren können^{93,94}. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten wir zeigen, dass die Galle, aber auch die Leber von PSC-Patienten stark mit pathogenen Keimen (z.B. *C.albicans, E.faecalis, S.aureus*) besiedelt ist, welche die Rekrutierung von Immunzellen wie Th17-Zellen induzieren⁵⁰ und IL-1 β – und IL-6-abhängig zur Th17-Induktion beitragen können²⁰². PSC-Lebern wiesen signifikant mehr IL-17-produzierende Zellen im Vergleich zu Kontrollen auf und aus PSC-Patienten isolierte periphere T-Zellen zeigten eine verstärkte Th17-Antwort nach Pathogenstimulation⁵⁰.

Da die Zytokine IL-1 β und IL-6 an der Th17-Induktion nach Stimulation mit pathogenen Bakterien und Pilzen beteiligt zu sein scheinen²⁰², wurden PBMCs aus Vollblut isoliert und mit hitzeinaktivierten Keimen über 24 h *in vitro* stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden anschließend mittels ELISA auf die Zytokinsekretion von IL-1 β und IL-6 untersucht. Die Ergebnisse der PSC-Kohorte wurden mit PBC-Patienten als weitere autoimmune cholestatische Lebererkrankung und gesunden Personen verglichen.

Aus PSC-Patienten isolierte PBMCs sezernierten im Vergleich zu PBMCs aus PBC-Patienten oder Gesundkontrollen signifikant mehr IL-1 β nach Stimulation mit dem Pilz *C.albicans* (s. Abb. 4a, PSC= 8222 pg/ml vs Gesund= 4831 pg/ml vs PBC= 4781 pg/ml, p= 0.005), dem pathogenen Bakterium *E.faecalis* (s. Abb. 4b, PSC= 12827 pg/ml vs Gesund= 7959 pg/ml vs PBC= 8227 pg/ml, p= 0,0015) oder *S.aureus* (s. Abb. 4c, PSC=10698 pg/ml vs Gesund= 6303 pg/ml vs PBC= 5683 pg/ml, p= 0,0046). Interessanterweise führte die Stimulation mit dem nicht-pathogenen Bakterium *E.coli* zu keinen Unterschieden in der Produktion von IL-1 β zwischen den Vergleichsgruppen (s. Abb. 4d, PSC= 5770 pg/ml vs Gesund=5691 pg/ml vs PBC=7169 pg/ml, p>0,05). Dieses Ergebnis ist konsistent mit

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, bei denen es nach Langzeitstimulation mit *E.coli* zu keinerlei signifikanten Unterschieden in der Th17-Frequenz zwischen der PSC-, PBC- und Gesund-Kohorte kam⁵⁰.





Aus peripherem Vollblut isolierte PBMCs ($3x10^{6}$ /ml) wurden über 24 h mit Keimen (10^{8} /ml) stimuliert und deren IL-1 β -Sekretion im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Stimulierung mit (a) *C.albicans*, (b) *E.faecalis*, (c) *S.aureus* und (d) *E.coli*; (*p≤0,05, **p≤0,01).

Die Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 war nach *C.albicans*-Stimulation in PSC-Patienten verglichen mit den anderen Kontrollkohorten signifikant erhöht (s. Abb. 5a, PSC= 14278 pg/ml vs Gesund= 8439 pg/ml vs PBC= 8974 pg/ml, p= 0,0005). Stimulierung mit *E.faecalis* verursachte zwar im Vergleich zu den gesunden Kontrollen eine signifikant gesteigerte IL-6-Produktion durch PBMCs der PSC-Patienten (s. Abb. 5b, PSC=20240 pg/ml vs Gesund= 12550 pg/ml, p= 0,0013), es zeigte sich aber kein Unterschied zwischen der PSC- und PBC-Gruppe (s. Abb. 5b, PBC= 18351 pg/ml, p>0,05). Es kam zu keinen

Unterschieden in der IL-6-Sekretion zwischen den 3 untersuchten Kohorten nach Stimulierung mit *S.aureus* (s. Abb. 5c, PSC= 28405 pg/ml vs Gesund= 22671 pg/ml vs PBC= 24073 pg/ml, p>0,05) und E.coli (s. Abb. 5d, PSC= 41558 pg/ml vs Gesund= 35063 pg/ml vs PBC= 35069 pg/ml, p>0,05).



Abb. 5: IL-6-Zytokinsekretion von PBMCs nach Stimulierung mit *C.albicans, E.faecalis, S.aureus* und *E.coli.* Vergleich zwischen Gesund-Kontrollen und PSC- und PBC-Patienten.

Aus peripherem Vollblut isolierte PBMCs ($3x10^6$ /ml) wurden über 24 h mit Keimen (10^8 /ml) stimuliert und deren IL-6-Sekretion im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Stimulierung mit (a) *C.albicans*, (b) *E.faecalis*, (c) *S.aureus* und (d) *E.coli*; (*p≤0,05, **p≤0,01).

Zusammenfassend zeigten PBMCs aus PSC-Patienten eine signifikant erhöhte Sekretion von IL-1 β nach Stimulation mit *C.albicans*, *E.faecalis* und *S.aureus* im Vergleich zu Gesund-Kontrollen und PBC-Patienten. Die IL-6-Produktion der PBMCs aus PSC-Patienten war nur nach Stimulation mit *C.albicans* gegenüber beiden Vergleichsgruppen signifikant erhöht, während die IL-6-Sekretion nach Stimulation mit *E.faecalis* bei der PSC-Gruppe zwar signifikant vermehrt im Vergleich zu den Gesunden vorlag, es aber zu keinem signifikanten

Unterschied zwischen der PSC- und PBC-Gruppe kam. Die Stimulation mit *S.aureus* führte zu keinerlei Unterschieden in der IL-6-Sekretion der PBMCs zwischen den 3 Gruppen.

3.2.2 Erhöhte Th17-Zellfrequenz und IL-17-Sekretion im peripheren Blut von PSC-Patienten

Da IL-17 gehäuft in der Leber von PSC-Patienten detektiert wurde, wurde nun untersucht, ob Patienten mit PSC eine verstärkte in vivo Differenzierung von CD4+ T-Zellen zu Th17-Zellen aufweisen und dadurch per se eine erhöhte Frequenz peripherer IL-17-produzierender Zellen gegenüber PBC- und AIH-Patienten sowie gesunden Kontrollen besitzen. Dies könnte möglicherweise ein Resultat der erhöhten Keimlast der Gallengänge bei PSC-Patienten sein. Es wurde Vollblut ex vivo unspezifisch mit PMA/Ionomycin stimuliert und der prozentuale Anteil von Th17-Zellen und IL-17-produzierenden NK-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Hierfür wurde zusätzlich zur Oberflächenfärbung eine intrazelluläre Zytokinfärbung Die Th17-Zellen erfolgte vorgenommen. Detektion der durch Anfärbung der Oberflächenmarker CD3+CD4+ und des intrazellulären Zytokins IL-17. Die IL-17-produzierenden NK-Zellen wurden als CD3-CD56+IL-17+ Lymphozyten identifiziert.

In Abb. 6a ist ein repräsentativer FACS-Blot mit der Gating-Strategie zur Identifikation von IL-17- und IFN γ -produzierenden CD4+ T-Zellen dargestellt. Es zeigte sich, dass Patienten mit PSC nach Stimulation einen signifikant erhöhten Anteil von Zellen des Th17-Phänotyps (PSC= 1,77%) gegenüber Gesund- (1,33%), PBC- (1,12%) und AIH-Kontrollen (1,11%) aufwiesen (s. Abb. 6b, p= 0,0033), wohingegen zwischen den Kontrollgruppen kein Unterschied detektierbar war. In der Frequenz der IL-17-produzierenden NK-Zellen wies die PSC-Gruppe keine Unterschiede zu den anderen Gruppen auf (s. Abb. 6c, PSC= 2,08% vs Gesund= 1,85% vs PBC= 1,25% vs AIH= 1,58%, p>0,05).

Th17-Zellen, die zusätzlich zu IL-17 auch IFN γ produzieren, sind als pathogener beschrieben^{112,113} und scheinen an der Entwicklung von Autoimmunität und Entzündungen des Darms beteiligt zu sein^{80,203}. Bei der durchflusszytometrischen Bestimmung des prozentualen Anteils von IL-17 und IFN γ co-produzierenden CD4+ T-Zellen (CD3+CD4+IL-17+IFN γ +) war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gesunden und der PSC- und AIH-Gruppe detektierbar (s. Abb. 6d, PSC= 0,36% vs Gesund= 0,30% vs AIH= 0,21%, p>0,05). Auffällig war, dass die Frequenz der IL-17/IFN γ co-produzierenden CD4+ Zellen in der PBC-Kohorte (0,18%) im Vergleich zu der PSC-Gruppe signifikant vermindert vorlag (p= 0,0158).



Abb. 6: Prozentuale Verteilung von IL-17- bzw. IL-17/IFNγ-produzierenden Zellen im peripheren Blut. Vergleich zwischen Gesund-Kontrollen und PSC-, PBC- und AIH-Patienten.

Peripheres Vollblut wurde *ex vivo* über vier Stunden mit PMA/Ionomycin stimuliert und durchflusszytometrisch die prozentualen Anteile IL-17-produzierender und IL-17/IFN γ co-produzierender Zellen bestimmt. (a) Repräsentative FACS-Blots der IL-17 und IFN γ positiven CD4+ T-Zellen einer gesunden Kontrolle. Frequenz (b) IL-17-produzierender CD4+ T-Zellen (CD3+CD4+IL-17+), (c) IL-17-produzierender NK-Zellen (CD3-CD56+IL-17+) und (d) IL-17/IFN γ co-produzierenden CD4+ T-Zellen (CD3+CD4+IL-17+); (*p≤0,05, **p≤0,01).

Da PSC-Patienten im peripheren Blut eine erhöhte Th17-Zellfrequenz nach Stimulation mit PMA/Ionomycin aufwiesen, wurde zur Bestätigung desweiteren die IL-17-Sekretion von PBMCs aus PSC- und PBC-Patienten und gesunden Kontrollen nach Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 über 96 h bestimmt. Die Analyse der Zytokinsekretion im Zellkulturüberstand erfolgte mittels ELISA. Es zeigte sich, dass im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe (939,2 pg/ml) und der PBC-Kohorte (1132 pg/ml) die IL-17-Sekretion der PSC-Gruppe (1639 pg/ml) signifikant verstärkt stattfand (s. Abb. 7, p=0,0014). Somit könnte die gesteigerte Th17-Antwort in PSC-Patienten nach Pathogenstimulation⁵⁰ durch die per se erhöhte periphere Th17-Frequenz und damit verbundene IL-17-Sekretion erklärt werden.



Abb. 7: IL-17-Zytokinsekretion von PBMCs nach Stimulierung des T-Zellrezeptors. Vergleich zwischen Gesund-Kontrollen und PSC- und PBC-Patienten.

Aus peripherem Vollblut isolierte PBMCs ($1x10^{6}$ /ml) wurden über 96 h mit anti-CD3 und anti-CD28 (je 1 µg/ml) stimuliert und deren IL-17-Zytokinsekretion im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt; (*p≤0,05, **p≤0,01).

3.2.3 Die Frequenz IFNγ-exprimierender Zellen im peripheren Blut und die IFNγ-Zytokinsekretion von PBMCs liegen bei PSC-Patienten unverändert zu Gesunden vor

Neben IL-17 wurde die Expression des pro-inflammatorischen Zytokins IFNy im peripheren Blut von PSC-Patienten untersucht. IFNy, das mit Gewebeschädigung assoziiert ist^{204,205}, wird von vielen Zellen des Immunsystems wie den zytotoxischen CD8+ T-Zellen, den Th1-Zellen, NK-Zellen und den γδ T-Zellen produziert. Nach Stimulierung von peripherem Vollblut mit PMA/Ionomycin wurde der prozentuale Anteil der IFNy-produzierenden CD4+ T-Zellen (CD3+CD4+), zytotoxischen T-Zellen (CD3+CD8+), NK-Zellen (CD3-CD56+) und $\gamma\delta$ T-Zellen (CD3+TCR $\gamma\delta$ +) nach Oberflächenfärbung und intrazellulärer Zytokinfärbung durchflusszytometrisch bestimmt. Während die Frequenz an IFNy-produzierenden CD4+ T-Zellen (s. Abb. 8a, PSC= 26,35% vs Gesund= 21,35% vs PBC= 27,4% vs AIH= 23,99%, p>0,05), $\gamma\delta$ T-Zellen (s. Abb. 8c, PSC= 71,94% vs Gesund= 72,11% vs PBC= 68,25% vs AIH= 69,67%, p>0,05) und NK-Zellen (s. Abb. 8d, PSC= 40,08% vs Gesund= 50,63% vs PBC= 38,94% vs AIH= 40,90%, p>0,05) keine signifikanten Unterschiede im peripheren Blut zwischen den analysierten Kohorten aufwies, zeigten Patienten mit PBC eine signifikant erhöhte Anzahl IFNy-produzierender CD8+ zytotoxischer T-Zellen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (s. Abb. 8b, PSC= 55,32% vs Gesund= 42,73% vs PBC= 64,94% vs AIH= 45,45%, p=0,0011).



Abb. 8: Prozentuale Verteilung von IFNγ-produzierenden Zellen im peripheren Blut. Vergleich zwischen Gesund-Kontrollen und PSC-, PBC- und AIH-Patienten.

Peripheres Vollblut wurde *ex vivo* über vier Stunden mit PMA/Ionomycin stimuliert und durchflusszytometrisch die prozentualen Anteile der (a) IFN γ -produzierenden CD4+ T-Zellen (CD3+CD4+ IFN γ +), (b) IFN γ -produzierenden CD8+ T-Zellen (CD3+CD8+ IFN γ +), (c) IFN γ -produzierenden $\gamma\delta$ T-Zellen (CD3+TCR $\gamma\delta$ +IFN γ +) und (d) IFN γ -produzierenden NK-Zellen (CD3-CD56+ IFN γ +) bestimmt; (**p \leq 0,01).

Um die IFNγ-Sekretion von T-Zellen zu untersuchen, wurden PBMCs isoliert und diese mit anti-CD3 und anti-CD28 über 96 h stimuliert. Die Zytokinmenge im Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA untersucht und die Ergebnisse zwischen PSC- und PBC-Patienten sowie gesunden Kontrollpersonen miteinander verglichen. Es ergaben sich dabei keine Unterschiede in der IFNγ-Produktion zwischen den untersuchten Gruppen (s. Abb. 9, PSC= 13990 pg/ml vs Gesund= 15160 pg/ml vs PBC= 13085 pg/ml, p>0,05). Dieses Ergebnis korreliert mit der vorherigen Beobachtung, dass, mit Ausnahme der CD8+ T-Zellen bei PBC-Patienten, keine Unterschiede in der Frequenz IFNγ-produzierender T-Zellen zwischen den analysierten Gruppen vorliegen (s. Abb. 8a, 8c, 8d). Somit scheint das pro-inflammatorische Zytokin IFNγ im peripheren Blut von PSC-Patienten eine untergeordnete Rolle zu spielen.



Abb. 9: IFNγ-Zytokinsekretion von PBMCs nach Stimulierung des T-Zellrezeptors. Vergleich zwischen Gesund-Kontrollen und PSC- und PBC-Patienten.

Aus peripherem Vollblut isolierte PBMCs ($1x10^{6}$ /ml) wurden über 96 h mit anti-CD3 und anti-CD28 (je 1 µg/ml) stimuliert und deren IFN γ -Zytokinsekretion im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt.

3.2.4 Verstärkte IL-13-Sekretion im peripheren Blut von PSC-Patienten

Auf Grund des fibrotischen Charakters der PSC wurde desweiteren die Sekretion des pro-fibrotischen Zytokins IL-13 sowohl in PSC- und PBC-Patienten als auch in Gesunden untersucht. IL-13 wird von verschiedenen Zellen des Immunsystems wie den CD4+ T-Zellen, NKT-Zellen und Mastzellen produziert²⁰⁶ und scheint entscheidend an der Fibrosierung vieler Organe, einschließlich der Leber, beteiligt zu sein²⁰⁷. Die IL-13-Sekretion wurde nach Stimulierung des T-Zellrezeptors mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Patienten mit PSC wiesen signifikant erhöhte IL-13 Mengen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen auf (s. Abb. 10, PSC= 3006 pg/ml vs Gesund= 2208 pg/ml, p= 0,0192). Im Vergleich zur PBC, einer Erkrankung, die ebenfalls einen fibrotischen Charakter aufweist. konnten keine Unterschiede detektiert werden (PBC= 2281 pg/ml, p>0,05). Die IL-13-Sekretion fand auch in den Zellen der PBC-Patienten verstärkt statt, hier zeigten sich aber keine signifikanten Unterschiede zu der gesunden Kontrollgruppe (p>0,05).



Abb. 10: IL-13-Zytokinsekretion von PBMCs nach Stimulierung des T-Zellrezeptors. Vergleich zwischen Gesund-Kontrollen und PSC- und PBC-Patienten.

Aus peripherem Vollblut isolierte PBMCs ($1x10^{6}$ /ml) wurden über 96 h mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 (je 1 µg/ml) stimuliert und deren IL-13-Zytokinsekretion im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt; (*p≤0,05).

3.3 Einfluss chronischer Darmentzündungen und Keimbesiedlung der Gallengänge auf die Zytokinexpression von PBMCs bei Patienten mit PSC

PSC ist stark mit chronischen entzündlichen Darmerkrankungen (CED) assoziiert⁵ und es kommt gehäuft zu Besiedlungen der Gallengänge mit pathogenen Keimen wie *C.albicans*⁵⁰. Durch die assoziierte CED könnten pathogene Bakterien durch den entzündeten permeablen Darm zur Leber translozieren und dort die Aktivierung des Immunsystems und Entzündung des biliären Trakts induzieren³⁹.

3.3.1 Verstärkte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine durch PBMCs von PSC-Patienten nach Stimulation mit pathogenen Keimen ist unabhängig von CED und Keimbesiedlung der Gallengänge

Es sollte nun ermittelt werden, ob die bei der PSC vorliegende erhöhte Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1ß und IL-6 durch PBMCs nach Stimulation mit den Keimen C.albicans, E.faecalis und S.aureus (s. Abb. 4+5) von einer assoziierten CED oder Keimbesiedlung der Gallengänge abhängig ist. Um dies zu untersuchen, erfolgte eine Subgruppen-Analyse der in 3.2.1 analysierten PSC-Patienten, deren PBMCs aus Vollblut isoliert und über 24 h mit hitzeinaktivierten Bakterien und Pilzen stimuliert wurden. Die durch PBMCs produzierten Mengen an IL-1ß und IL-6 im Zellkulturüberstand wurden zwischen PSC-Patienten ohne und mit assoziierter CED verglichen. Die IL-1ß-Sekretion der PBMCs nach Stimulierung mit C.albicans (s. Abb. 11a, PSC ohne CED= 9621 pg/ml vs PSC+CED= 7405 pg/ml, p>0,05), *E.faecalis* (s. Abb. 11c, PSC ohne CED= 14828 pg/ml vs PSC+ CED= 11650 pg/ml, p>0,05) und S.aureus (s.Abb. 11e, PSC ohne CED= 12325 pg/ml vs PSC + CED= 9387 pg/ml, p>0,05) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen PSC-Patienten mit bzw. ohne assoziierte CED. Auch bei der IL-6-Sekretion nach Stimulation mit C.albicans (s. Abb. 11b, PSC ohne CED= 14594 pg/ml vs PSC+CED= 14448 pg/ml, p>0.05), *E.faecalis* (s. Abb. 11d, PSC ohne CED= 21264 pg/ml vs PSC + CED= 19914 pg/ml, p>0.05) und S.aureus (s. Abb. 11f, PSC ohne CED= 33871 pg/ml vs PSC + CED= 26029 pg/ml, p>0,05) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.



Abb. 11: IL-1β- und IL-6-Zytokinsekretion von PBMCs nach Stimulierung mit *C.albicans, E.faecalis* und *S.aureus*. Vergleich zwischen PSC-Patienten ohne bzw. mit assoziierter CED.

Aus peripherem Vollblut isolierte PBMCs ($3x10^{6}$ /ml) wurden über 24 h mit pathogenen Keimen (10^{8} /ml) stimuliert und deren IL-1 β – (a, c, d) und IL-6-Zytokinsekretion (b, d, e) im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Stimulierung mit (a, b) *C.albicans*, (c, d) *E.faecalis* und (e, f) *S.aureus*.

Es wurde nun die IL-1ß- und IL-6-Sekretion von PBMCs bei Patienten ohne und mit Keimbesiedlung der Galle verglichen, um einen potentiell durch die Gallengangsbesiedlung induzierten Effekt zu identifizieren. Es zeigte sich, dass die durch Gallekultur nachweisbare Keimbesiedlung der Gallengänge anscheinend keinen Effekt auf die Produktion von IL-1ß und IL-6 durch PBMCs nach Stimulierung mit C.albicans (s. Abb. 12a+12b, IL-1ß: PSC ohne Keime= 7002 pg/ml vs PSC+ Keime= 8370 pg/ml, p>0,05; IL-6: PSC ohne Keime= 12888 pg/ml vs PSC+ Keime= 15284 pg/ml, p>0,05) und *E.faecalis* (s. Abb. 12c+ 12d, IL-18: PSC ohne Keime= 13823 vs PSC+ Keime= 12634 pg/ml, p>0.05; IL-6: PSC ohne Keime= 16457 pg/ml vs PSC+ Keime= 20854 pg/ml, p>0,05) aufwies. Hierbei ist aber zu beachten, dass die Gruppengröße von PSC-Patienten ohne Besiedlung der Gallengänge womöglich zu klein war, um vergleichende Aussagen über den Einfluss von Gallengangskulturen machen zu können. Zusätzlich wurde der Einfluss der Gallengangsbesiedlung auf die IL-1 β - und IL-6-Produktion von PBMCs nach Stimulierung mit S.aureus untersucht (nicht dargestellt). Hier kam es zu keinen Unterschieden zwischen Patienten ohne und mit Gallengangsbesiedlung, es können aber keine sicheren Aussagen gemacht werden, da die Gruppengröße der PSC-Patienten ohne Keimbelastung zu klein war und weitere Analysen folgen müssen. Somit scheint die erhöhte Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1β und IL-6 nach Stimulation mit *C.albicans* (s. Abb. 4a+ 5a) bzw. von IL-1β nach Stimulation mit *E.faecalis* (s. Abb. 4b) und *S.aureus* (s. Abb. 4c) ein

spezifischer Mechanismus der PSC zu sein, der unabhängig von einer CED und einer

Keimbesiedlung der Gallengänge ist.



Abb. 12: IL-1 β – und IL-6-Zytokinsekretion von PBMCs nach Stimulierung mit *C.albicans* und *E.faecalis*. Vergleich zwischen PSC-Patienten ohne bzw. mit nachgewiesener Keimbesiedlung der Gallengänge. Aus peripherem Vollblut isolierte PBMCs (3x10⁶/ml) wurden über 24 h mit pathogenen Keimen (10⁸/ml) stimuliert und deren IL-1 β – (a+ c) und IL-6-Zytokinsekretion (b+ d) im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Stimulierung mit (a, b) *C.albicans* und (c, d) *E.faecalis*.

3.3.2 Erhöhte Th17-Zellfrequenz und IL-17-Sekretion im peripheren Blut von PSC-Patienten ist unabhängig von CED und Keimbesiedlung der Gallengänge

Um zu ermitteln, ob die in 3.2.2 nachgewiesene Erhöhung der Th17-Frequenz im peripheren Blut von PSC-Patienten (s. Abb. 6b) von einer assoziierten CED oder von einer Keimbesiedlung der Gallengänge abhängt, erfolgte eine Subgruppen-Analyse der in 3.2.2 eingeschlossenen PSC-Patienten. Hierfür wurde die Th17-Zellfrequenz (CD3+CD4+IL-17+) von PSC-Patienten ohne bzw. mit assoziierter CED sowie ohne bzw. mit durch Gallekultur nachgewiesener Keimbesiedlung der Gallengänge nach PMA/Ionomycin Restimulierung durchflusszytometrisch analysiert und miteinander verglichen. Es waren keine signifikanten Unterschiede im prozentualen Anteil der Th17-Zellen zwischen der PSC-Kohorte ohne CED (2,06%) und mit CED (1,51%) erkennbar (s. Abb. 13a, p= 0,0943). Es fiel aber auf, dass der Anteil von Zellen des Th17-Phänotyps in Patienten ohne CED tendenziell erhöht gegenüber der Gruppe mit CED vorlag. Auch zwischen der PSC-Kohorte ohne (1,92%) bzw. mit Keimbesiedlung der Gallengänge (1,44%) traten keine signifikanten Unterschiede in der Th17-Frequenz auf (s. Abb. 13b, p>0,05). Somit scheint die erhöhte periphere Th17-Frequenz charakteristisch für die PSC zu sein und resultiert vermutlich nicht aus der assoziierten CED oder kulturell nachweisbaren Keimbesiedlung der Gallengänge.



Abb. 13: Prozentuale Verteilung von IL-17-produzierenden Zellen im peripheren Blut von PSC-Patienten. PeripheresVollblut wurde *ex vivo* über vier Stunden mit PMA/Ionomycin stimuliert und durchflusszytometrisch die prozentualen Anteile der IL-17-produzierenden CD4+ T-Zellen (CD3+CD4+IL-17+) bestimmt. (a) Vergleich zwischen Patienten ohne bzw. mit assoziierter CED, (b) Vergleich zwischen Patienten ohne bzw. mit nachgewiesener Keimbesiedlung der Gallengänge.

PBMCs aus PSC-Patienten zeigten in 3.2.2 nach Stimulierung des T-Zellrezeptors eine erhöhte IL-17-Sekretion (s. Abb. 7). Um herauszufinden, ob es sich hierbei um einen Effekt handelt, der von der assoziierten CED bzw. Keimbesiedlung der Gallengänge abhängig ist, erfolgte eine Subgruppen-Analyse der in 3.2.2 untersuchten PSC-Patienten. Hierbei wurde die IL-17-Zytokinsekretion der PBMCs, die über 96 h mit anti-CD3 und anti-CD28 stimuliert wurden und deren Zytokinsekretion im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt wurde, zwischen PSC-Patienten ohne und mit assoziierter CED bzw. ohne und mit nachgewiesener Keimbesiedlung der Gallengänge verglichen. Die erhöhte IL-17-Produktion schien unabhängig von einer CED zu erfolgen, da kein Unterschied zwischen PSC-Patienten ohne und mit CED

vorlag (s. Abb. 14a, PSC ohne CED= 1613 pg/ml vs PSC + CED= 1653 pg/ml, p>0,05). Auch ein Einfluss von Keimen in der Galle auf die IL-17-Sekretion schien ausgeschlossen, da es zwischen den PSC-Kohorten ohne und mit Keimbesiedlung zu keinen signifikanten Unterschieden kam (s. Abb. 14b, PSC ohne Keime= 2090 pg/ml vs PSC+ Keime= 1668 pg/ml, p>0,05).



Abb. 14: IL-17-Zytokinsekretion von PBMCs nach Stimulierung des T-Zellrezeptors.

Aus peripherem Vollblut isolierte PBMCs ($1x10^{6}$ /ml) wurden über 96 h mit anti-CD3 und anti-CD28 (je 1 µg/ml) stimuliert und deren IL-17-Zytokinsekretion im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. (a) Vergleich zwischen PSC-Patienten ohne bzw. mit assoziierter CED, (b) Vergleich zwischen PSC-Patienten ohne bzw. mit nachgewiesener Keimbesiedlung der Gallengänge; (*p≤0,05, **p≤0,01).

3.4 Charakterisierung der leukozytären Zellzusammensetzung im peripheren Blut von PSC-Patienten

Es sollte nun untersucht werden, ob es im peripheren Blut der PSC-Patienten zu einem gestörten Verhältnis der Zellpopulationen kommt. Hierfür wurde die Frequenz der Monozyten, Neutrophilen, Lymphozyten, pDCs, DCs und MAIT-Zellen bestimmt.

3.4.1 Anteile der Leukozyten- und Lymphozyten finden sich bei PSC-Patienten unverändert zu Kontrollen

Um den Einfluss unterschiedlicher Zellpopulationen im peripheren Blut von PSC-Patienten zu untersuchen, wurde die Zellzusammensetzung der Leukozytenpopulationen im Vollblut durchflusszytometrisch Anteile anhand der prozentualen von Lymphozyten (CD45+CD14-CD16-), Neutrophilen (CD45+CD16+) und Monozyten (CD45+CD14+) bestimmt. In Abb. 15a ist ein exemplarisches Beispiel der Gating-Strategie aufgezeigt. Um Abweichungen innerhalb der PSC-Zellpopulationen zu identifizieren, wurden die Ergebnisse mit den autoimmunen Lebererkrankungen PBC und AIH sowie gesunden Kontrollen verglichen. Es zeigte sich in den prozentualen Verhältnissen der Lymphozyten kein Unterschied zwischen den PSC-Patienten und den gewählten Kontrollgruppen (s. Abb. 15b, PSC= 33,24% vs Gesund= 35,52% vs PBC= 32,73% vs AIH= 2,14%, p>0,05). Ebenso erbrachte die Analyse der Neutrophilen (s. Abb. 15c, PSC=56,91% vs Gesund= 54,89% vs PBC= 56,87% vs AIH= 65,08%, p>0,05) und Monozyten (s. Abb. 15d, PSC= 7,38% vs Gesund= 6,60% vs PBC= 7,40% vs AIH= 5,70%, p>0,05) keine Unterschiede in der prozentualen Verteilung der Zellpopulationen. Dies lässt darauf schließen, dass per se keine Dysbalance im Verhältnis von Leukozyten im Vollblut von PSC-Patienten im Vergleich zu den Kontrollgruppen vorliegt.



Abb. 15: Prozentuale Verteilung von Lymphozyten, Neutrophilen und Monozyten im peripheren Blut. Vergleich zwischen Gesund-Kontrollen und PSC-, PBC- und AIH-Patienten.

Periphere Leukozyten im Vollblut wurden durchflusszytometrisch auf die prozentualen Anteile von Lymphozyten, Neutrophilen und Monozyten untersucht. (a) Repräsentative FACS-Blots einer gesunden Kontrolle mit der Gating-Strategie. Frequenz von (b) Lymphozyten (CD14-CD16-), (c) Neutrophilen (CD16+) und (d) Monozyten (CD14+) in CD45+ Leukozyten.

Um herauszufinden, ob sich innerhalb der Lymphozytenpopulation Abweichungen in der Frequenz von Zellen finden lässt, die eventuell relevant für die Pathogenese der PSC sind, wurde die Lymphozytenpopulation (CD45+CD14-CD16-) auf ihre prozentualen Anteil von TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen (CD3+CD19-CD56-TCR $\gamma\delta$ -) und die darin enthaltenen CD4+ T-Zellen $(CD3+CD4+CD19-CD56-TCR\gamma\delta)$ sowie auf TCR $\gamma\delta$ + T-Zellen (TCR $\gamma\delta$ +), B-Zellen NK-Zellen (CD3-CD19-CD56+TCRγδ–) (CD19+), und NKT-Zellen (CD3+CD19-CD56+TCRγδ-) untersucht. In Abb. 16a ist eine exemplarische Gating-Strategie aufgezeigt. Die Anteile von TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen (s. Abb. 16b, PSC= 58,66% vs Gesund= 62,37% vs PBC= 58,92% vs AIH= 61,77%, p>0,05), CD4+ T-Zellen (s. Abb. 16c, PSC= 70,20% vs Gesund= 67,05% vs PBC= 72,56% vs AIH= 70,57%, p>0,05) und B-Zellen (s. Abb. 16e, PSC= 11,04% vs Gesund= 11,18% vs PBC= 12,97% vs AIH= 10,12%, p>0,05) lagen im peripheren Blut der PSC-Patienten im gleichen Maße wie bei den anderen untersuchten Kohorten vor. Da sich TCRαβ+ T-Zellen aus CD4+ und CD8+ T-Zellen zusammensetzen und keine Unterschiede in der prozentualen Verteilung der CD4+ T-Zellen innerhalb der TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen vorlagen, war auch von einer gleichen Verteilung der CD8+ TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen zwischen den untersuchten Gruppen auszugehen.

Auch bei der Frequenz an NKT-Zellen, die über die Oberflächemoleküle CD3+CD56+ identifiziert wurden, zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen (s. Abb. 16g, PSC= 3,30% vs Gesund= 2,08% vs PBC= 3,14% vs AIH= 3,45%, p>0,05). Die NKT-Zellpopulation enthielt sowohl die invarianten Typ I als auch die Typ II NKT-Zellen. Außerdem befanden sich in der CD3+CD56+ Zellpopulation auch MAIT-Zellen, welche später noch genauer charakterisiert werden.

Die lymphozytäre NK-Zellfrequenz (s. Abb 16f) war bei AIH-Patienten (5,59%) im Vergleich zu den anderen Gruppen (PSC= 6,99% vs Gesund= 9,06% vs PBC= 7,41%) verringert, es kam aber zu keinen signifikanten Differenzen (p>0,05). Bei den TCR $\gamma\delta$ + T-Zellen (s. Abb. 16d) zeigte die PBC-Gruppe (2,26%) eine signifikant verminderte Frequenz im Vergleich zu gesunden Kontrollen (3,52%) und PSC-Patienten (4,07%, p= 0,0185). Auch die Anzahl von TCR $\gamma\delta$ + T-Zellen in AIH-Patienten (3,05%) schien vermindert im Vergleich zu PSC-Patienten und gesunden Personen, es kam aber zu keinen signifikanten Unterschieden (p>0,05).



Abb. 16: Prozentuale Verteilung von Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut. Vergleich zwischen Gesunden und PSC-, PBC- und AIH-Patienten.

Periphere Lymphozyten im Vollblut wurden durchflusszytometrisch auf die prozentualen Anteile von TCRαβ+ T-Zellen, CD4+ T-Zellen, TCRγδ+ T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und NKT-Zellen untersucht. (a) Repräsentative FACS-Blots einer gesunden Kontrolle mit der Gating-Strategie. Frequenz von (b) TCRαβ+ T-Zellen (CD19-TCRγδ-CD3+CD56-), (c) CD4+ T-Zellen (CD19-TCRγδ-CD3+CD56-CD4+), (d) TCRγδ+ T-Zellen (TCRγδ+), (e) B-Zellen (CD19+), (f) NK-Zellen (CD19-TCRγδ-CD3-CD56+) und (g) NKT-Zellen (CD19-TCRγδ-CD3+CD56+) innerhalb der Lymphozytenpopulation (CD14-CD16-); (*p≤0,05).

3.4.2 Frequenz der pDCs und DCs ist im peripheren Blut von PSC-Patienten im Vergleich zu Kontrollgruppen unverändert

In Genomweiten Assoziationsstudien zeigte sich eine Assoziation zwischen PSC und Polymorphismen im plasmazytoiden Transkriptionsfaktor E2-2/Tcf4³⁰. Um zu bestimmen, ob bei der PSC Veränderungen in der Frequenz der plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) im peripheren Blut vorliegen, wurde der prozentuale Anteil von pDCs an CD4+ Leukozyten durchflusszytometrisch im Vollblut von PSC-Patienten untersucht. Als Kontrollen wurden PBC- und AIH-Patienten sowie Gesunde analysiert. Abb. 17a zeigt eine repräsentative Darstellung der Gating-Strategie anhand der Expression von CD45, CD4, CD123 und BDCA-2 (CD303). Es zeigten sich keine Unterschiede in der pDC-Frequenz zwischen den untersuchten Kohorten (s. Abb. 17b, PSC= 0,46% vs Gesund= 0,58% vs PBC= 0,46% vs AIH= 0,49%, p>0,05).

a



Abb. 17: Frequenz von pDCs im peripheren Blut. Vergleich zwischen Gesund-Kontrollen und PSC-, PBC- und AIH-Patienten.

Periphere Leukozyten im Vollblut wurden durchflusszytometrisch auf die prozentualen Anteile von pDCs untersucht. (a) Repräsentative FACS-Blots einer gesunden Kontrolle mit der Gating-Strategie: pDCs wurden über co-Expression von CD123 und CD303 in CD45+CD4+ Leukozyten identifiziert. (b) Frequenz der pDCs an CD4+CD45+ Leukozyten.

Ergänzend zu der Frequenz plasmazytoider DCs wurde auch die Frequenz der Gesamtpopulation peripherer dendritischer Zellen (DCs) untersucht. Hierfür wurde im Vollblut von PSC-, PBC- und AIH-Patienten sowie gesunden Kontrollen der prozentuale Anteil von DCs durchflusszytometrisch bestimmt. Diese setzten sich hierbei aus den pDCs und den klassischen myeloiden DCs (cDCs) zusammen. Die Identifikation der DCs erfolgte durch die Oberflächenfärbung von CD45 und HLA-DR sowie der fehlenden Expression weiterer Zelltyp-spezifischer Oberflächenmarker (Lineage-Marker) wie CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 und CD56 (s. Abb. 18a). Es zeigte sich, wie auch schon bei der pDC-Anzahl, keine krankheitsbedingte Beeinflussung der DC-Frequenz im peripheren Blut der analysierten Gruppen (s. Abb. 18b, PSC= 1,19% vs Gesund= 0,96% vs PBC= 0,72% vs AIH= 1,51%, p>0,05).

a



Abb. 18: Frequenz von DCs im peripheren Blut. Vergleich zwischen Gesund-Kontrollen und PSC-, PBC- und AIH-Patienten.

Periphere Leukozyten im Vollblut wurden durchflusszytometrisch auf die prozentualen Anteile von DCs untersucht. (a) Repräsentative FACS-Blots einer gesunden Kontrolle mit der Gating-Strategie: DCs wurden über die Expression von HLA-DR und der fehlenden Expression von CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56 (Lineage-) in CD45+ Leukozyten identifiziert. (b) Frequenz der DCs an CD45+ Leukozyten.

3.4.3 Verminderte MAIT-Zellfrequenzen im peripheren Blut von Patienten mit autoimmuner und viraler Leberentzündung sowie chronischer Darmentzündung

Auf Grund der Assoziation von PSC mit CED sowie der Keimbesiedlung der Galle^{5,7}, wurde die Frequenz antimikrobieller MAIT-Zellen überprüft, um deren Rolle im Krankheitsbild der PSC zu untersuchen. Es ist bereits bekannt, dass bei Erkrankungen mit einer gestörten Balance **D**armmikrobioms wie chronischen modifizierte des Darmentzündungen MAIT-Zelllfrequenzen im peripheren Blut auftreten^{161,162}. Der prozentuale Anteil von MAIT-Zellen an T-Zellen wurde durchflusszytometrisch im Vollblut von Patienten mit PSC, PBC, AIH und gesunden Kontrollen analysiert. Die MAIT-Zellen wurden dabei anhand ihrer Oberflächenexpression von CD3, CD161 und V α 7.2 identifiziert. Eine exemplarische Darstellung der Gating-Strategie ist in Abb. 19a aufgeführt. Als Kontrollgruppe zu den autoimmunen Lebererkankungen erfolgte die Bestimmung der MAIT-Frequenz in Patienten HCV-Leberentzündung, mit nicht-autoimmuner viraler chronisch entzündlicher Darmerkrankung Colitis Ulcerosa (UC) und der Gelenksentzündung Rheumatoider Arthritis (RA). Interessanterweise zeigten alle autoimmunen und viralen Leberentzündungen eine signifikant verminderte Rate von peripheren MAIT-Zellen im Vergleich zu der gesunden Kontroll-Kohorte (s. Abb. 19b, PSC= 1,97% vs Gesund= 4,95% vs PBC= 1,28% vs AIH= 0,97% vs HCV= 1,23%, p< 0,0001). Auch bei Colitis Ulcerosa Patienten war die periphere Frequenz der MAIT-Zellen (1,63%) verglichen mit den gesunden Kontrollen signifikant reduziert. Bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis konnte im Vergleich zu Gesunden keine Beeinträchtigung der MAIT-Zellzahl in der Peripherie festgestellt werden (RA= 4,45% vs Gesund= 4,95%, p>0,05). Somit konnte eine Verringerung der peripheren MAIT-Zellen in autoimmunen und viralen Erkrankungen der Leber und des Darms detektiert werden. Es ist nicht auszuschließen, dass MAIT-Zellen aus der Peripherie in die betroffenen Organe einwandern.



Abb. 19: Frequenz von MAIT-Zellen im peripheren Blut. Vergleich zwischen Gesund-Kontrollen und Patienten mit PSC, PBC, AIH, HCV, Colitis Ulcerosa und Rheumatoider Arthritis.

Periphere Lymphozyten im Vollblut wurden durchflusszytometrisch auf die prozentualen Anteile von MAIT-Zellen untersucht. (a) Repräsentative FACS-Blots einer gesunden Kontrolle mit der Gating-Strategie: MAIT-Zellen wurden über co-Expression von CD161 und V α 7.2 in CD3+ Lymphozyten identifiziert. (b) Frequenz der MAIT-Zellen an CD3+ Lymphozyten; (*p $\leq 0,05$, **p $\leq 0,01$, ***p $\leq 0,001$).

3.4.4 Verminderte MAIT-Zellfrequenz im peripheren Blut von PSC-Patienten ist unabhängig von CED und Keimbesiedlung der Gallengänge

Um den Einfluss von CED und Keimbesiedlung der Galle auf die Frequenz der MAIT-Zellen erfolgte Subgruppen-Analyse der 3.4.3 zu analysieren, eine in untersuchten PSC-Patienten. Es wurden zunächst PSC-Patienten ohne und mit CED verglichen. Dies war von Interesse, da MAIT-Zellen bei Patienten mit Colitis Ulcerosa im peripheren Blut vermindert vorzuliegen scheinen (s. Abb. 19b)^{161,162}. Zusätzlich wurde auch die in 3.4.3 analysierte Gesund-Kohorte und die Gruppe der Patienten mit Colitis Ulcerosa nochmals graphisch dargestellt, um so einen möglichen Einfluss der PSC-assoziierten CED auf die verminderte MAIT-Zellfrequenz im peripheren Blut von PSC-Patienten genauer untersuchen zu können. Es stellte sich heraus, dass im Vergleich zu den Gesunden (4,95%) sowohl die beiden PSC-Kohorten als auch die UC-Patienten eine signifikant verminderte MAIT-Zellfrequenz im peripheren Blut aufwiesen (s. Abb. 20a, PSC ohne CED= 2,21% vs PSC+ CED= 1,72% vs UC= 1,63%, p= 0,0005) und dass zwischen den beiden PSC-Kohorten und der UC-Kohorte kein signifikanter Unterschied vorlag, so dass die verminderte MAIT-Zellzahl bei der PSC kein von der CED abhängiger Effekt zu sein scheint. Desweiteren wurde im peripheren Blut von PSC-Patienten die Beeinflussung der MAIT-Zellzahl durch die kulturell nachgewiesene Keimbesiedlung der Gallengänge analysiert. Die Keimbesiedlung zeigte keine Auswirkung auf die Anzahl der MAIT-Zellen (s. Abb. 20b), so konnte zwischen Patienten ohne bzw. mit Keimbesiedlung kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (PSC ohne Keime= 1,93% vs PSC+ Keime= 1,40%, p= 0,4827).



Abb. 20: Frequenz von MAIT-Zellen im peripheren Blut.

Periphere Lymphozyten im Vollblut wurden durchflusszytometrisch auf die prozentualen Anteile von MAIT-Zellen (CD3+CD161+V α 7.2+) untersucht. (a) Vergleich zwischen Gesund-Kontrollen, UC- und PSC-Patienten ohne bzw. mit assoziierter CED, (b) Vergleich zwischen PSC-Patienten ohne bzw. mit nachgewiesener Keimbesiedlung der Gallengänge.

3.5 Charakterisierung regulatorischer Zellen und Moleküle im peripheren Blut von PSC-Patienten

Ein möglicher Einfluss von regulatorischen T-Zellen auf die Pathogenese der PSC wird postuliert, da Genomweite Assoziationsstudien eine Assoziation zwischen PSC und Polymorphismen in Loci des IL-2-Rezeptors und von IL-2/IL-21 aufzeigten, die für die Treg-Funktion relevant sind^{31,37}. Desweiteren konnten wir in Vorarbeiten zeigen, dass Patienten mit PSC eine verringerte Frequenz an CD25_{high}CD127_{low}Foxp3+ Tregs in der Peripherie und der Leber im Vergleich zu Kontroll-Patienten aufwiesen und dass die reduzierte Treg-Anzahl im peripheren Blut signifikant mit Homozygotie im Hauptallel des PSC-assoziierten SNP "rs10905718" im *IL2-RA* Locus korreliert⁴⁹.

3.5.1 Tr1-Frequenz ist im peripheren Blut von PSC-Patienten unverändert zu Kontrollgruppen

Es sollte nun untersucht werden, ob im peripheren Blut die Frequenz weiterer regulatorischer T-Zellpopulationen wie der Tr1-Zellen bei der PSC beeinflusst ist. Dafür wurde der prozentuale Anteil von Tr1-Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Die Tr1-Zellen wurden hierbei über die Oberflächenexpression von CD45+, CD45RA-, CD4+, CCR5+, CCR6-, PD-1+ und CD127- charakterisiert (bisher unveröffentlichte Tr1-Identifizierung, modifiziert nach Jens Geginat, National Institute of Molecular Genetics (INGM), Mailand, Italien). Die Untersuchung erfolgte im Vollblut aus PSC-, PBC- und AIH-Patienten und aus gesunden Kontrollen. In Abb. 21a ist eine repräsentative Darstellung der Gating-Strategie aufgezeigt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den 4 untersuchten Gruppen (s. Abb. 21b, PSC= 0,37% vs Gesund= 0,40% vs PBC= 0,43 % vs AIH= 0,59%, p>0,05), so dass die Frequenz der Tr1-Zellen im Unterschied zu den CD25_{high}CD127_{low}Foxp3+ Tregs bei PSC-Patienten nicht verändert zu sein scheint.



Abb. 21: Frequenz von Tr1-Zellen im peripheren Blut. Vergleich zwischen Gesund-Kontrollen und PSC-, PBC- und AIH-Patienten.

CD4+ T-Zellen im peripheren Vollblut wurden durchflusszytometrisch auf die prozentualen Anteile von Tr1-Zellen untersucht. (a) Repräsentative FACS-Blots einer gesunden Kontrolle mit der Gating-Strategie: Tr1-Zellen wurden über die co-Expression von PD-1 und CCR5 und die fehlenden Expression von CD45RA, CCR6 und CD127 in CD4+ T-Lymphozyten identifiziert, (b) Frequenz der Tr1-Zellen an CD4+ T-Zellen.

3.5.2 Verminderte IL10-Sekretion durch PBMCs im peripheren Blut von PSC-Patienten

Da wir in Vorarbeiten zeigen konnten, dass Patienten mit PSC eine verminderte Anzahl von Tregs im peripheren Blut aufwiesen⁴⁹, wurde auch die Produktion des immunregulatorischen Zytokins bei PSC-Patienten analysiert. Verminderte Spiegel von IL-10 sind mit autoimmunen und inflammatorischen Erkrankungen²⁰⁸ wie der Rheumatoiden Arthritis²⁰⁹ und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen²¹⁰ assoziiert. Die Produktion von IL-10 wurde mittels ELISA im Zellkulturüberstand nach Stimulierung von PBMCs über 96 h mit T-Zellrezeptorspezifischen Antikörpern gegen CD3 und CD28 untersucht. Die Isolierung der PBMCs erfolgte aus PSC- und PBC-Patienten und Gesunden. Patienten mit PSC wiesen im Vergleich zu der PBC- und gesunden Kohorte signifikant verminderte Spiegel an IL-10 auf (s. Abb. 22a, PSC=2212 pg/ml vs Gesund= 3172 pg/ml vs PBC= 3069 pg/ml, p= 0,0066). Die reduzierte IL-10-Produktion schien unabhängig von einer assoziierten CED zu sein, da zwischen PSC-Patienten ohne bzw. mit CED kein Unterschied erkennbar war (s. 22b, PSC ohne CED= 2472 pg/ml vs PSC + CED= 2074 pg/ml, p>0,05). Die bei PSC-Patienten

vermindert vorliegende IL-10-Produktion könnte das Resultat einer erniedrigten Anzahl regulatorischer T-Zellen sein, die auch schon in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen wurde⁴⁹.



Abb. 22: IL-10-Zytokinsekretion von PBMCs nach Stimulierung des T-Zellrezeptors.

Aus peripherem Vollblut isolierte PBMCs ($1x10^{6}$ /ml) wurden für 96 h mit anti-CD3 und anti-CD28 (je 1 µg/ml) stimuliert und deren IL-10-Sekretion im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. (a) Vergleich zwischen PSC-, PBC- und gesunden Kontroll-Patienten, (b) Vergleich zwischen Patienten ohne bzw. mit assoziierter CED; (*p≤0,05).

3.5.3 Verminderte Frequenz GARP-exprimierender Tregs im peripheren Blut von PSC-Patienten

Neben der verminderten Frequenz regulatorischer T-Zellen konnten wir in Vorarbeiten auch eine verminderte *in vitro* suppressive Kapazität der Tregs von PSC-Patienten nachweisen⁴⁹. Um mögliche zu Grunde liegende Mechanismen der eingeschränkten Treg-Funktion bei der PSC zu klären, wurden Tregs phänotypisch charakterisiert und deren Oberflächenexpression von regulatorischen Molekülen analysiert. Dafür wurden PBMCs aus PSC- und PBC-Patienten sowie aus gesunden Kontrollen isoliert und über 72 h in Anwesenheit von 100 U/ml Interleukin-2 stimuliert. Anschließend wurde die Expression von GARP, PD-1 und CTLA-4 auf der Oberfläche von Tregs durchflusszytometrisch bestimmt. Aus technischen Gründen konnte die Expression von Gal-9 nicht auf der Treg-Oberfläche von CD4+ Effektor-T-Zellen untersucht wurde. Tregs wurden über die Oberflächenexpression von CD3, CD4, CD25_{high} und CD127_{low} sowie die intrazelluläre Expression ihres Transkriptionsfaktors Foxp3
identifiziert. Effektor-T-Zellen wurden als CD3+, CD4+, CD25_{low}, CD127+ und Foxp3definiert. Zusätzlich zur Bestimmung der prozentualen Anteile von GARP-, PD-1-, CTLA-4und Tim-3-exprimierenden Tregs bzw. Effektor-T-Zellen wurde auch die mittlere Stärke der Oberflächenexpression mittels integrierter mittlerer Fluoreszenzintensität (iMFI) analysiert. Die Anzahl GARP-exprimierender Tregs war bei PSC-Patienten (5,6%) im Vergleich zu PBC-Patienten (12,34%) und gesunden Kontrollen (9,51%) signifikant erniedrigt (s. Abb. 23a, p= 0,0029). Auch die mittlere Stärke der GARP-Expression war auf Tregs aus PSC-Patienten (4473) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (7517), aber nicht PBC-Patienten (9404), signifikant reduziert (s. Abb. 23b, p=0,0083). Weder die Anzahl CTLA-4- (s. Abb. 23c, PSC= 2,95% vs Gesund= 2,48% vs PBC= 2,56%, p>0,05) und PD-1-exprimierender Tregs (s. Abb. 23e, PSC= 7,17% vs Gesund= 8,21% vs PBC= 7,59%) noch deren mittlere Oberflächenexpressionsstärke (CTLA-4 s. Abb. 23d, PSC= 5663 Gesund= 4151 vs PBC= 4058, p>0,05; PD-1 s. Abb. 23f, PSC= 17938 vs Gesund= 19952 vs PBC= 15997, p>0,05) zeigten Auffälligkeiten bei der PSC-Kohorte im Vergleich zu den Kontrollgruppen.



Abb. 23: Frequenz und iMFI von GARP-, CTLA-4- und PD-1-exprimierenden Tregs nach Stimulierung mit IL-2 im peripheren Blut. Vergleich zwischen Gesund-Kontrollen und PSC- und PBC-Patienten.

Aus peripherem Vollblut isolierte PBMCs ($1x10^{6}$ /ml) wurden über 72 h mit IL-2 (100 U/ml)) stimuliert und die Oberflächenexpression regulatorischer Moleküle auf CD4+CD25_{high}CD127_{low} Foxp3+ Tregs durchflusszytometrisch analysiert. Prozentuale Bestimmung der (a) GARP-, (c) CTLA-4- und (e) PD-1- exprimierenden Tregs. Quantifizierung der (b) GARP-, (d) CTLA-4- und (f) PD-1-Oberflächenexpression auf Tregs mittels iMFI; (*p≤0,05, **p≤0,01).

Auch der prozentuale Anteil Tim-3-exprimierender Effektor-T-Zellen (s. Abb. 24a, PSC= 2,75% vs Gesund= 2,51% vs PBC= 2,82%, p>0,05) und die Tim-3-Oberflächenexpressionsstärke (s. Abb. 24b, PSC= 5367 vs Gesund= 4670 vs PBC= 5200, p>0,05) zeigte keine signifikanten Differenzen zwischen den 3 untersuchten Kohorten.



Abb. 24: Frequenz und iMFI von Tim-3-exprimierenden Effektor-T-Zellen nach Stimulierung mit IL-2 im peripheren Blut. Vergleich zwischen Gesund-Kontrollen und PSC- und PBC-Patienten.

Aus peripherem Vollblut isolierte PBMCs (1x10⁶/ml) wurden über 72 h mit IL-2 (100 U/ml)) stimuliert und die Tim-3-Expression von CD3+CD4+CD25_{low}CD127+Foxp3- Effektor-T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. (a) prozentuale Bestimmung der Tim-3-exprimierenden Effektor-T-Zellen. (b) Quantifizierung der Tim-3-Oberflächenexpression auf Effektor-T-Zellen mittels iMFI.

3.6 Charakterisierung der Apoptosesensitivität von T-Zellen im peripheren Blut von PSC-Patienten

Genomweite Assoziationsstudien zur PSC konnten Assoziationen mit Polymorphismen im *BCL2L11*-Locus, welcher das pro-apoptotischen Bim kodiert, aufzeigen^{27,35}. Es sollte nun sowohl die Apotosesensitivität von Effektor-T-Zellen als auch deren Expression von pro- bzw. anti-apoptotischen Molekülen bestimmt werden.

3.6.1 PSC-Patienten weisen eine verminderte Apoptoserate der CD4+ T-Zellen nach RICD und CWID auf

Zur Analyse der Apoptosesensitivität humaner T-Lymphozyten wurden T-Zellen aus PBMCs isoliert und über 72 h mit anti-CD3 und anti-CD28 stimuliert. Die so aktivierten Effektor-T-Zellen proliferierten dann über 7 d in Anwesenheit von IL-2, bevor die Apoptose induziert wurde. Als Kontrollgruppe dienten T-Zellen, bei denen keine Apoptose induziert wurde. Die Apoptoseinduktion erfolgte durch Restimulierung mit anti-CD3 in Anwesenheit von IL-2 (RICD) bzw. durch Deprivation von IL-2 über 24 h. Die Analyse der Apoptosesensitivität erfolgte durchflusszytometrisch durch Bestimmung der vitalen T-Zellen (CD4+ und CD8+), an die der Apoptosemarker Annexin V nicht gebunden hatte. Die Ergebnisse sind als prozentualer Zellverlust an CD4+ bzw. CD8+ T-Zellen dargestellt und wurden zwischen PSC- und PBC-Patienten und Gesunden verglichen. Durch die Bestimmung des Zellverlusts konnten Aussagen über die Apoptoserate der Zellen gemacht werden. Abb. 25a zeigt eine exemplarische Darstellung der Gating-Strategie. CD4+ T-Zellen aus PSC-Patienten zeigten sowohl auf die Apoptoseinduktion durch Restimulierung des T-Zellrezeptors (s. Abb. 25b, PSC= 20,85% vs Gesund= 30,11% vs PBC=33,60%, p= 0,0002) als auch durch IL-2-Entzug (s. Abb. 25d, PSC= 7,119% vs Gesund= 12,06% vs PBC= 12,28%, p=0,003) reduzierte Apoptoseraten im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Hingegen lagen beim prozentualen Zellverlust der CD8+ T-Zellen weder nach RICD (s. Abb. 25c, PSC= 24,97% vs Gesund= 29,31% vs PBC= 30,49%, p>0,05) noch nach CWID (s. Abb. 25e, PSC= 12,64% vs Gesund=15,50% vs PBC=14,31%, p>0,05) signifikante Unterschiede zwischen PSC-Patienten und den anderen Kohorten vor.

Beim Vergleich zwischen RICD und CWID fiel auf, dass der Zellverlust nach RICD sowohl bei den CD4+ als auch bei den CD8+ T-Zellen (s. Abb. 25b+25c) in allen untersuchten Kohorten deutlich stärker ausfiel als durch CWID (s. Abb. 25c+25d).



Abb. 25: Apoptosesensitivität der CD4+ und CD8+ T-Zellen nach RICD bzw. CWID im peripheren Blut. Vergleich zwischen Gesund-Kontrollen und PSC- und PBC-Patienten.

Aus peripherem Vollblut isolierte T-Zellen (1x10⁶/ml) wurden über 72 h mit anti- CD3 und anti-CD28 (je 1µg/ml) aktiviert und anschließend über 7d in Anwesenheit von IL-2 (100 U/ml)) kultiviert. Die Induktion der Apoptose erfolgte über 24 h durch Restimulierung mit anti-CD3 (100 ng/ml) in Anwesenheit von IL-2 (100 U/ml) (RICD) bzw. Deprivation von IL-2 (CWID). Der Zellverlust wurde durchflusszytometrisch mittels Annexin V Färbung der CD4+ und CD8+ T-Zellen bestimmt. (a) Repräsentative FACS-Blots der CD4+, CD8+ und Annexin V Färbung einer gesunden Kontrolle. (b) RICD der CD4+ T-Zellen, (c) RICD der CD8+ T-Zellen, (d) CWID der CD4+ T-Zellen, (e) CWID der CD8+ T-Zellen; (**p≤0,01, ***p≤0,001).

3.6.2 Verminderte Hochregulierung von Bim nach RICD in T-Zellen von PSC-Patienten

Die pro-apoptotischen Proteine Bim und Fas/Fas-Ligand scheinen Schlüsselrollen bei der Apoptose von T-Zellen zu haben. Bei Dysfunktion können sie sich gegenseitig kompensieren und scheinen sowohl am RICD als auch am CWID beteiligt zu sein, wodurch sie effizient die T-Zellhomöostase regulieren^{163,164,171,189}. Um zu Grunde liegende Mechanismen der verminderten T-Zellapoptose bei der PSC zu identifizieren, wurde die Expression der pro-apoptotischen Proteine Bim und Fas-Ligand nach Apoptoseinduktion analysiert. Zusätzlich wurde auch die Expression des pro-apoptotischen Effektormoleküls Bak, welches die direkte Permeabilisierung der Mitochondrien induziert¹⁸⁶, und des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 untersucht. Hierzu wurde RICD bzw. CWID über 6 h in T-Zellen induziert, bevor die mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben wurde. Die cDNA konnte anschließend mittels quantitativer PCR-Analyse auf die Expression von Bim, Fas-Ligand, Bak und Bcl-2 untersucht werden. Für die Bestimmung der relativen Expression wurde das Haushaltsgen GAPDH eingesetzt. Als Kontrollgruppe dienten T-Zellen ohne Apoptoseinduktion, so dass die Induktion von Bim, Fas-Ligand, Bak und Bcl-2 nach RICD und CWID relativ zu unbehandelten T-Zellen (=1) berechnet werden konnte. Die Ergebnisse wurden zwischen PSC- und PBC-Patienten und Gesunden verglichen. Hierbei zeigte sich, dass die Expression von Bim nach Apoptoseinduktion durch Restimulierung bei den PBC-Patienten (12,77) und Gesunden (12,90) signifikant erhöht im Vergleich zu den PSC-Patienten (6,77) vorlag (s. Abb. 26a, p=0,0098), während die Expression von Fas-Ligand nach Restimulierung zwischen den 3 Gruppen gleich stark hochreguliert war (s. Abb. 26b, PSC= 2,70 vs Gesund= 3,83 vs PBC= 3,43, p>0,05). Weder im Expressionsprofil des pro-apoptotischen Effektors Bak (s. Abb. 26c, PSC= 0,95 vs Gesund= 0,93 vs PBC= 1,11, p>0,05) noch des anti-apoptotischen Bcl-2 (s. Abb. 26d, PSC= 1,86 vs Gesund= 0,98 vs PBC= 1,23, p>,005) kam es nach Apoptoseinduktion durch Restimulierung zu Unterschieden zwischen den untersuchten Gruppen. Die Expression von Bak und Bcl-2 schien nur geringfügig durch den Prozess des RICD beeinflusst zu sein, da deren Expressionsniveau im Vergleich zu T-Zellen ohne RICD (=1) kaum verändert war (s. Abb. 26c+26d).



Abb. 26: Expression der pro-apoptotischen Moleküle Bim, Fas-Ligand und Bak und des anti-apoptotischen Bcl-2 in T-Zellen nach RICD im peripheren Blut. Vergleich zwischen Gesund-Kontrollen und PSC- und PBC-Patienten.

Aus peripherem Vollblut isolierte T-Zellen ($1x10^{6}$ /ml) wurden über 72 h mit anti-CD3 und anti-CD28 (je 1µg/ml) aktiviert und anschließend über 7d in Anwesenheit von IL-2 (100 U/ml)) kultiviert. Die Induktion der Apoptose erfolgte über 6 h durch Restimulierung mit anti-CD3 (100 ng/ml) in Anwesenheit von IL-2 (100 U/ml). Die mRNA wurde aus den T-Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer PCR auf die Expression von (a) Bim, (b) Fas-Ligand, (c) Bak und (d) Bcl-2 untersucht. Es wurde die relative Expression zum Haushaltsgen GAPDH bestimmt und dann n-fach zur Expression unbehandelter T-Zellen (=1) dargestellt; (*p≤0,05).

Nach Deprivation von IL-2 über 6 h zeigten sich keine Unterschiede in der Regulierung von Bim zwischen den 3 Kohorten (s. Abb. 27a, PSC= 3,54 vs Gesund= 3,69 vs PBC= 3,68, p>0,05). Die Expression von Fas-Ligand lag bei PBC-Patienten (1,25) verglichen mit PSC-Patienten (0,78) signifikant verstärkt vor (s. Abb. 27b, p=0,0368). Im Vergleich zu gesunden Kontrollen (0,97) zeigten sich weder bei PSC-Patienten noch bei PBC-Patienten signifikante Unterschiede in der Expression von Fas-Ligand nach CWID (p>0,05). Der IL-2-Entzug bewirkte keine Unterschiede im Expressionsprofil von Bak (s. Abb. 27c, PSC= 1,63 vs Gesund= 2,04 vs PBC= 1,93, p>0,05) und Bcl-2 (s. Abb. 27d, PSC= 0,48 vs Gesund= 0,82 vs PBC= 0,40, p>0,05) zwischen den analysierten Gruppen.

Es fiel auf, dass Fas-Ligand eine untergeordnete Rolle im T-Zelltod durch IL-2-Deprivation zu spielen schien, da die exprimierte Menge an Fas-Ligand nach CWID im Vergleich zu T-Zellen ohne CWID (=1) nahezu unverändert war. Dagegen führte Entzug von IL-2 zur etwa vierfachen Hochregulierung der Bim-Expression in den untersuchten Kohorten im Vergleich zu unbehandelten T-Zellen (=1). Die Bak-Expression wurde durch CWID (s. Abb. 27c) im Vergleich zu T-Zellen ohne Apoptoseinduktion ungefähr verdoppelt, während sich die Expression vom anti-apoptotischen Bcl-2 etwa halbierte (s. Abb. 27d).



Abb. 27: Expression der pro-apoptotischen Moleküle Bim, Fas-Ligand und Bak und des anti-apoptotischen Bcl-2 in T-Zellen nach CWID im peripheren Blut. Vergleich zwischen Gesund-Kontrollen und PSC- und PBC-Patienten.

Aus peripherem Vollblut isolierte T-Zellen ($1x10^{6}$ /ml) wurden über 72 h mit anti- CD3 und anti-CD28 (je 1µg/ml) aktiviert und anschließend über 7d in Anwesenheit von IL-2 (100 U/ml)) kultiviert. Die Induktion der Apoptose erfolgte über 6 h durch Deprivation von IL-2. Die mRNA wurde aus den T-Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer PCR auf die Expression von (a) Bim, (b) Fas-Ligand, (c) Bak und (d) Bcl-2 untersucht. Es wurde die relativen Expression zum Haushaltsgen GAPDH bestimmt und dann n-fach zur Expression unbehandelter T-Zellen (=1) dargestellt; (*p≤0,05).

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung immunologischer Prozesse, die an der Pathogenese der PSC beteiligt sein könnten. Es wurden experimentelle Ansätze verfolgt, die auf unseren Vorarbeiten zum Ungleichgewicht zwischen Immunzellaktivierung und Immunzellregulierung und den genetischen Assoziationsstudien zur PSC aufbauten.

4.1 Untersuchung der Expression pro-inflammatorischer Zytokine im peripheren Blut von PSC-Patienten

Die Pathogenese der PSC ist weitgehend unbekannt. Dies hat zur Folge, dass es bisher keine wirksame Therapie der PSC gibt⁶. Es ist daher von essentieller Bedeutung, Mechanismen der Pathogenese zu identifizieren, um so Therapiestrategien zu entwickeln, die den progressiven Verlauf der Erkrankung aufhalten können. Die starke Assoziation der PSC mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen⁵ weist darauf hin, dass die Interaktion zwischen Keimen und Immunzellen eine Rolle in der Pathogenese der PSC zu spielen scheint. Hierbei könnten die Keime die Leber entweder auf Grund der Entzündung und Barrierestörung des Darms über das Pfortaderblut erreichen oder sie passieren die biliären Epithelbarrieren. Im Blut von PSC-Patienten konnte man atypische perinukleäre antineutrophile zytoplasmatische Antikörper nachweisen, die mit bakteriellen Proteinen der Darmflora kreuzreagieren. Dieser Fund bestärkt die Annahme, dass eine abnormale Immunreaktion gegenüber Darmmikroben einer der pathogenetischen Mechanismen der PSC zu sein scheint²¹¹. Desweiteren zeigte sich, dass bakterielle und fungale Cholangitiden den Progress der PSC zu beschleunigen scheinen, wobei vor allem die Besiedlung mit *C.albicans* ein prognostisch ungünstiges Zeichen zu sein scheint^{212,213}.

In eigenen Vorarbeiten konnten wir bei PSC-Patienten eine Besiedlung der Galle mit pathogenen Keimen und bakterielle RNA in den Portalfeldern aufzeigen⁵⁰, was dort zur Aktivierung des Immunsystems und Entzündung des biliären Trakts führen könnte³⁹. Neben der erhöhten Keimlast konnten wir in den Portalfeldern der PSC-Patienten verstärkt IL-17-produzierende Lymphozyten detektieren⁵⁰. Th17-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr extrazellullärer Pathogene^{50,214}, scheinen aber auch an der Entstehung vieler Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoider Arthritis und Multiple Sklerosis beteiligt zu sein^{94,215}. Bei der stark mit PSC assoziierten CED zeigte sich in Kindern nach Stimulierung mit *C.albicans* eine aberrante Th17-Antwort²¹⁶. In Vorarbeiten konnten wir bereits zeigen, dass PSC-Patienten nach *in vitro* Stimulation von PBMCs mit den pathogenen Keimen *C.albicans*,

E.faecalis und *S.aureus* eine verstärkte Th17-Antwort aufwiesen, die unabhängig von einer assoziierten CED war⁵⁰.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun im peripheren Blut untersucht werden, welche Mechanismen zur erhöhten Th17-Antwort nach *in vitro* Stimulation von PBMCs mit hitzeinaktivierten pathogenen Bakterien und Pilzen beitragen könnten. Da die Stimulierung mit pathogenen Keimen wie *C.albicans* und *S.aureus* IL-1 β - und IL-6-abhängig die Induktion von humanen Th17-Zellen zu fördern scheint²⁰², wurde in dieser Arbeit untersucht, ob es bei der PSC durch Pathogenstimulation zu einer verstärkten Sekretion dieser beiden pro-inflammatorischen Zytokine kommt.

Es zeigte sich, dass PBMCs aus PSC-Patienten im Vergleich zu Gesund-Kontrollen und PBC-Patienten eine signifikant erhöhte Sekretion von IL-1 β nach Stimulation mit *C.albicans* (s. Abb. 4a), *E.faecalis* (s. Abb. 4b) und *S.aureus* (s. Abb. 4c) aufwiesen. In einer humanen Studie wurde bereits gezeigt, dass nach Stimulierung von PBMCs mit *C.albicans* eine verstärkte Th17-Antwort vorlag, wobei die IL-1 β -Produktion der PBMCs essentiell für die Th17-Differenzierung zu sein schien²⁰². IL-1 β wird als der entscheidende Faktor der humanen Th17-Differenzierung beschrieben²⁰² und induziert zusammen mit IL-6 oder anderen Zytokinen wie IL-23 und IL-21 die IL-17-Produktion in CD4+ T-Zellen¹⁰³.

Neben IL-1 β zeigte sich auch eine erhöhte IL-6-Produktion durch PBMCs nach Stimulierung mit *C.albicans* (s. Abb. 5a) und *E.faecalis* (s. Abb. 5b) bei PSC-Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bzw. den Gesund-Kontrollen. Eine verstärkte IL-1 β -Produktion zusammen mit IL-6 könnte demnach bei PSC-Patienten zu einer erhöhten Th17-Konversion nach *in vitro* Stimulation mit pathogenen Keimen führen. Ob die Stimulierung von PBMCs mit pathogenen Keimen auch zu einer verstärkten Produktion von IL-21 und IL-23 bei PSC-Patienten führt, wurde in dieser Arbeit aus technischen Gründen nicht untersucht. Beide Zytokine scheinen bei der humanen Th17-Differenzierung und Stabilisierung involviert zu sein¹⁰⁴.

Es wurde außerdem überprüft, ob die verstärkte IL-1 β - und IL-6-Zytokinsekretion bei PSC-Patienten nach Pathogenstimulation im Zusammenhang mit einer assoziierten CED stand. Es zeigte sich, dass sowohl die IL-1 β - als auch die IL-6-Produktion in der von uns analysierten PSC-Kohorte anscheinend unabhängig von einer assoziierten CED (s. Abb. 11) erfolgte. Inwieweit die in der vorliegenden Arbeit untersuchte IL-1 β - und IL-6-Sekretion nach Pathogenstimulation durch die Keimbesiedlung der Gallengänge beeinflusst wurde, konnte auf Grund der kleinen Gruppengröße der PSC-Patienten ohne Keimbesiedlung nicht final geklärt werden (s. Abb. 12). Es ist nicht auszuschließen, dass die Keime durch den Prozess der ERCP in die Leber gelangen, wobei 24% der von uns in Vorarbeiten untersuchten PSC-Patienten Gallengangskulturen ohne vorherige Manipulation der Gallengänge aufwiesen⁵⁰. Außerdem bleibt zu bemerken, dass bei den untersuchten PSC-Patienten der Nachweis einer Keimbesiedlung der Gallengänge durch Gallekultur zeitlich unabhängig von den Analysen der vorliegenden Arbeit erfolgte, so dass sich der Zustand der Keimlast in den Gallengängen verändert haben könnte. Auch die übliche Antibiotikagabe nach einer ERCP kann Einfluss auf die Keimbesiedlung der Galle haben.

Die erhöhten IL-1β- und IL-6-Spiegel bei PSC-Patienten nach Pathogenstimulation könnten darauf hinweisen, dass bei der PSC CD4+ T-Zellen prädisponiert sind zu Th17-Zellen zu differenzieren. In den Portalfeldern von PSC-Lebern konnten bereits verstärkt IL-17-exprimierende Lymphozyten im Vergleich zu Kontrollgruppen detektiert werden⁵⁰, weshalb in dieser Arbeit weiterhin analysiert werden sollte, ob bei PSC-Patienten per se eine erhöhte Th17-Frequenz im peripheren Blut vorliegt. Hierbei zeigte sich, dass PSC-Patienten im Vergleich zu Kontrollgruppen eine signifikant erhöhte Th17-Zellfrequenz im peripheren Blut aufwiesen (s. Abb. 6b). Zudem wiesen PBMCs aus PSC-Patienten im Vergleich zu Kontrollgruppen eine signifikant stärkere IL-17-Sekretion auf (s. Abb. 7). Zur erhöhten Th17-Zellfrequenz im peripheren Blut von PSC-Patienten könnte eine gesteigerte Th17-Konversion durch verstärkte Sekretion der Zytokine IL-1 β (s. Abb. 4a-4c) und IL-6 (s. Abb. 5a-5c) beitragen. Sowohl die erhöhte Th17-Frequenz als auch die IL-17-Sekretion der PBMCs schienen unabhängig von einer assoziierten CED (s.Abb. 13a+14a) vorzuliegen und charakteristisch für die PSC zu sein. Ob diese Ergebnisse in Abhängigkeit zur Keimbesiedlung der Gallengänge stehen, konnte auf Grund der geringen PSC-Patientenzahl ohne Keimbesiedlung im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig analysiert werden (s. Abb. 13b+14b). Inwieweit die genetische Assoziation zwischen PSC und Polymorphismen in Genloci von REL, CARD9, IL-21 und FUT2, die relevant für die Pathogenbeseitigung, Th17-Differenzierung und die biliäre bakterielle Zusammensetzung sind^{36,37,92}, Einfluss auf die gesteigerte IL-1β- und IL-6-Zytokinsekretion sowie die erhöhte Th17-Frequenz im peripheren Blut und in der Leber von PSC-Patienten hat, bleibt noch zu klären. Hierfür werden zurzeit die in diese Arbeit eingeschlossenen Individuen auf SNPs in diesen PSC-prädisponierenden Loci untersucht.

Auf Grund des möglichen Einflusses von Th17-Zellen auf die Entstehung der PSC, könnte der Einsatz von IL-17-inhibierenden Antikörpern einen protektiven Effekt auf deren Krankheitsverlauf ausüben. Bei Morbus Crohn Patienten, die erhöhte Raten an Th17-Zellen im Gastrointestinaltrakt aufweisen^{112,217}, erzielte ein monoklonaler neutralisierender Antikörper gegen IL-17 keine protektive Antwort. Daher scheint IL-17 dort nicht allein an der

Gewebeschädigung beteiligt zu sein²¹⁸. Da Th17-Zellen auf Grund ihrer starken Plastizität funktionelle Eigenschaften von Th1-Zellen annehmen können, könnten diese als hochpathogen beschriebenen IL-17/IFNy co-produzierenden Th1/Th17-Zellen^{46,48} sowohl in die Pathogenese der PSC als auch der assoziierten CED involviert sein. In einem IL-23-abhängigen Mausmodell der Kolitis konnte bereits gezeigt werden, dass Th1/Th17-Zellen in die Erkrankung involviert sind, wobei IFNy die Hauptursache für die Gewebeschädigung zu sein scheint^{204,205}. Auch im Mausmodell der Multiplen Sklerose scheinen diese Th1/Th17-Zellen alleine in der Lage zu sein eine experimentelle autoimmune Encephalomyelitis (EAE) auszulösen^{219,220}. In der vorliegenden Arbeit konnte im peripheren Blut per se kein Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen hinsichtlich der Frequenz der IL-17/IFNy co-produzierenden Th1/Th17-Zellen detektiert werden (s. Abb. 7d). Nach Pathogenstimulation von PBMCs zeigte sich aber eine signifikante Erhöhung der Frequenz IL-17/IFNy co-produzierender Th1/Th17-Zellen bei der PSC im Vergleich zu Kontrollgruppen, was bereits in Studien unserer Arbeitsgruppe festgestellt wurde⁵⁰. Daher kann man spekulieren, dass Stimulation mit pathogenen Keimen bei der PSC eine verstärkte Konversion von Th17-Zellen zu Th1/Th17-Zellen induziert. Ob dieser Prozess in den mit Keimen besiedelten Gallengängen von PSC-Patienten erfolgt, bleibt noch zu klären.

Bei der PSC scheint die Keimbesiedlung der Gallengänge mit intestinalen Bakterien zu einer verstärkten Immunantwort gegenüber Pathogen-assoziierten Mustern (PAMPS) wie Lipopolysacchariden und Lipoteichonsäuren zu führen. Diese scheint dann durch Toll-Like-Rezeptor (TLR) 4-abhängige Mechanismen eine Beschädigung der Tight-Junctions zwischen den biliären Epithelzellen (BECs) zu induzieren. Cholangiozyten sind dadurch schädlichen Substanzen wie Gallensäuren ausgesetzt²²¹ und exprimieren vermehrt Adhäsionsmoleküle, inflammatorische und pro-fibrotische Zytokine und Chemokine²²². In entzündeten PSC-Lebern konnte bereits eine gesteigerte Produktion des Chemokinliganden CCL20 detektiert werden, welcher von BECs produziert wird. Aktivierte Th17-Zellen, die den CCL20-Rezeptor CCR6 in großen Mengen auf ihrer Oberfläche exprimieren¹¹⁶, können so verstärkt zu den Gallengängen rekrutiert werden²²³. IL-17 scheint nach Bindung an den auf BECs exprimierten IL-17-Rezeptor einen positiven Rückkopplungsmechanismus zu induzieren, indem es die CCL20-Produktion amplifiziert²²³. Somit könnte dieser durch Keime induzierte CCL20-abhängige Mechanismus einer der Gründe für die gehäufte Anzahl IL-17-produzierender Lymphozyten in den Portaltrakten von PSC-Lebern darstellen⁵⁰. Um dies für die PSC zu verifizieren, müsste in nachfolgenden Studien die Expression des Chemokinrezeptors CCR6 auf leberinfiltrierenden Th17-Zellen im Vergleich zu Kontrollkohorten untersucht werden. Außerdem müsste analysiert werden, ob aktivierte Th17-Zellen von PSC-Patienten eine verstärkte Expression an CXCR3 aufweisen, so dass sie über CXCR3/CXCL9-11 Interaktion vermehrt das sinusoidale Endothel passieren und in die Leber migrieren können^{223,224}.

Zusammengefasst erscheint es möglich, dass die Entzündungsreaktion in PSC-Lebern durch den vermehrten Kontakt mit Keimen sowie die Veränderung des Mikrobioms der Galle²²⁵ initiiert wird. Dies könnte zu einer verstärkten IL-1 β - und IL-6-Produktion von BECs führen und dadurch eine dysregulierte Th17-Antwort induzieren. Die Bindung von IL-17 an den IL-17-Rezeptor auf BECs scheint deren IL-1 β -, IL-6- und IL-23-Produktion zu fördern, so dass letztlich eine parakrine Rückkopplungsreaktion entstehen könnte²²⁶. Dieser Effekt scheint eine pro-fibrotisch Wirkung zu haben²²⁷ und könnte zur unkontrollierten portalen und biliären Entzündung bei der PSC beitragen.

Um die Rolle weiterer pro-inflammatorischer Zytokine bei der PSC-Pathogenese zu identifizieren, wurde neben IL-1 β , IL-6 und IL-17 auch IFN γ analysiert. In Vorarbeiten konnten wir bereits zeigen, dass PSC-Patienten im Vergleich zu Kontrollgruppen keinen Unterschied in der Frequenz IFN γ -produzierender CD4+ T-Zellen nach Stimulation von PBMCs mit pathogenen Keimen aufwiesen⁵⁰. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich nun, dass es auch per se weder in der Frequenz IFN γ -exprimierender Lymphozyten im peripherem Blut (s. Abb. 8) noch in der IFN γ -Sekretion von PBMCs (s. Abb. 9) zu signifikanten Unterschieden zwischen PSC-Patienten und gesunden Kontrollen kam. Dies weist darauf hin, dass im Gegensatz zur PBC⁵², die IFN γ -Expression im peripheren Blut von PSC-Patienten eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Ob dies auch für die Leber zutrifft, bleibt zu spekulieren.

Da es bei Patienten mit PSC zur Fibrosierung der Gallengänge kommt⁶, wurde desweiteren die Sekretion des pro-fibrotischen Zytokins IL-13 analysiert. IL-13 wirkt über den Rezeptor IL-13Rα2, welcher unter anderem auf Makrophagen, Monozyten und hepatischen Sternzellen exprimiert wird und die Sekretion des pro-fibrotischen TGF-β1 induziert²²⁸. IL-13 scheint eine wichtige Funktion bei allergischen Erkrankungen und Asthma zu haben²²⁹. Die Rolle von IL-13 bei der Pathogenese der stark mit PSC assoziierten CED wird kontrovers diskutiert. Während Fuss et al. einen Effekt von IL-13-produzierenden NKT-Zellen bei der Pathogenese inflammatorischer Darmerkrankungen zeigten²³⁰, konnten aktuellere Studien dies nicht replizieren²³¹. Unsere Ergebnisse zeigen, dass bei der PSC die Sekretion des pro-fibrotischen Zytokins IL-13 durch PBMCs im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht vorlag (s. Abb. 10). Dies weist darauf hin, dass IL-13 an der Fibrose der PSC beteiligt sein könnte. Auch eine vergleichende Untersuchung der Expression der pro-inflammatorischen bzw. pro-fibrotischen Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-13, IL-17 und IL-23 im Lebergewebe von PSC-, PBC- und AIH-Patienten wurde im Rahmen dieser Arbeit begonnen. Diese erbrachte bisher keine gesicherten Ergebnisse, da ein Mangel an humanen Lebergewebe besteht und die intrahepatisch exprimierte Zytokinmenge häufig unterhalb der Nachweisgrenze lag. Diese Expressionsanalyse wurde daher nicht in der vorliegenden Arbeit dargestellt.

4.2 Charakterisierung der leukozytären Zellzusammensetzung im peripheren Blut von PSC-Patienten

Das erhöhte Vorkommen von IL-17-produzierenden Zellen in PSC-Patienten weist darauf hin, dass funktionelle Unterschiede in der Lymphozytenpopulation im Vergleich zu Gesunden vorliegen könnten. Um festzustellen, ob die leukozytäre Zellzusammensetzung im Vollblut von PSC-Patienten Veränderungen aufweist, wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Hierbei stellte sich heraus, dass der Anteil von Lymphozyten (s. Abb. 15b), Monozyten (s. Abb. 15d) und Neutrophilen (s. Abb. 15c) keinen Unterschied zwischen PSC-Patienten und Kontrollgruppen aufwies. Auch innerhalb der Lymphozytenpopulation kam es bei PSC-Patienten zu keinen Unterschieden im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (s. Abb. 16). Somit scheinen die Relationen der Leukozytenzellpopulationen im peripheren Blut von Patienten mit PSC nicht beeinflusst zu sein. Wie die Verteilung in der Leber von PSC-Patienten ist, wird zurzeit noch von uns erforscht. Da nur wenig Lebermaterial im Rahmen von Biopsien zur Verfügung steht, können hierüber noch keine klaren Angaben gemacht werden.

Obwohl keine Unterschiede in den oben aufgeführten Leukozytenpopulationen vorlagen, könnten in der Zusammensetzung weiterer Zellpopulationen Defekte vorliegen. So wurde auf Grund der Assoziation zwischen PSC und Polymorphismen im Genlocus von *E2-2/Tcf4*, welcher für den Mastertranskriptionsfaktor der plasmazytoiden DCs kodiert³⁰, die Frequenz von pDCs bei der PSC und Kontrollgruppen im peripheren Blut bestimmt. Plasmazytoide DCs zeichnen sich durch ihre starke Produktion an Typ I Interferonen aus und scheinen bei einer Vielzahl von Erkrankungen impliziert zu sein¹⁹³. Dies wurde unter anderem für Allergien, Asthma²³² und Lupus Erythematodes gezeigt. Bei Patienten mit Lupus sind die Frequenzen zirkulierender peripherer pDCs verringert, wohingegen sich vermehrt Akkumulationen aktivierter, Interferon-produzierender pDCs in betroffenen Geweben wie der Haut finden²³³. Dies scheint nicht für die PSC zuzutreffen, da im peripheren Blut im Vergleich zu Kontrollgruppen keine Veränderungen der pDC-Frequenz detektiert werden konnte

(s. Abb. 17). Ob es zu einer gesteigerten Akkumulation von pDCs in PSC-Lebern kommt, konnte auf Grund fehlenden Lebergewebes nicht bestimmt werden.

Da Gallengänge und Lebern von Patienten mit PSC häufig eine Besiedlung mit Keimen wie *E.coli, S. aureus* und *C.albicans* aufweisen⁵⁰, wurden MAIT-Zellen untersucht, welche eine wichtige Rolle bei der Detektion und Regulation mikrobieller Infektionen zu spielen scheinen¹⁵⁹. Hierfür wurde die MAIT-Zellfrequenz im peripheren Blut von PSC-Patienten und Kontrollgruppen bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass im Vergleich zu Gesunden und Patienten mit der autoimmunen Gelenksentzündung Rheumatoide Arthritis, die MAIT-Zellfrequenz in allen autoimmunen und viralen Leberentzündungen signifikant vermindert vorlag (s. Abb. 19b). Auch bei Patienten mit der chronischen Darmentzündung Colitis Ulcerosa, die mit PSC assoziiert ist, war die periphere MAIT-Zellzahl vermindert, was mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen übereinstimmt²³⁴. Eine Verminderung der peripheren MAIT-Zellzahl wurde auch bei Patienten mit Typ I Diabetes²³⁵, Lupus Erythematodes²³⁶ und neurologischen Entzündungsreaktionen wie der Multiplen Sklerose^{237,238} beschrieben.

Die reduzierte Anzahl von MAIT-Zellen im peripheren Blut könnte mit ihrem stark ausgeprägten Gewebetropismus zusammenhängen, wobei sie bevorzugt im Darm, der Lunge und der Leber zu finden sind^{150,156}. Bei Patienten mit bakteriellen und fungalen Infektionen scheint es zu einer verstärkten Rekrutierung der MAIT-Zellen zu den Infektionsherden zu kommen¹⁵⁵. Dies wurde unter anderem für Patienten mit aktiver Tuberkulose und Pneumonie gezeigt, bei denen im Blut im Gegensatz zu gesunden Kontrollen kaum pathogen-reaktive MAIT-Zellen detektierbar waren, wobei hier aber eine verstärkte MAIT-Zellakkumulation in den infizierten Lungen der Patienten vorlag^{153,239}. Somit könnte es im Zuge der in dieser Arbeit untersuchten pathogenetischen Leber- und Darmentzündungen zu einer Einwanderung der MAIT-Zellen in die betroffenen Gewebe und einem damit verbunden Verlust von MAIT-Zellen im peripheren Blut kommen. Um dies zu verifizieren, wäre die Analyse von Leber- und Darmgewebe notwendig, die bereits in unserer Arbeitsgruppe erfolgt. Ob MAIT-Zellen mechanistisch in den Prozess der untersuchten Erkrankungen impliziert sind oder unspezifisch aus dem Blut zum Ort der Entzündung wandern, ist noch unklar¹⁵⁰. Im betroffenen Gewebe könnten sie antimikrobielle Aktivität wie die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-17 und IFNy ausüben^{193,194}. Die funktionelle Analyse humaner leberinfiltrierender MAIT-Zellen erweist sich aber auf Grund des Mangels an humanem Gewebe, speziell von nicht-pathologischem Gewebe, als schwierig.

MAIT-Zellen können bis zu 45% der Leberlymphozyten darstellen¹⁵⁶ und scheinen die Hauptproduzenten von IL-17 in der humanen Leber zu sein^{157,158}. Es wurde eine gesteigerte

Anzahl IL-17-produzierender Lymphozyten in Lebern von PSC-Patienten detektiert⁵⁰, wobei noch nicht geklärt ist, ob es sich hierbei um Th17- oder MAIT-Zellen handelt. Möglicherweise kommt es auf Grund der vermehrten Keimbesiedlung bei der PSC initial zu einer gesteigerten Rekrutierung von MAIT-Zellen in die Leber und Gallengänge, wo sie dann bei der Bekämpfung der Infektion involviert sind und dabei große Mengen IL-17 und weiterer pro-inflammatorischer Zytokine produzieren, welche wiederum die Gewebeentzündung fördern.

4.3 Charakterisierung regulatorischer Zellen und Moleküle im peripheren Blut von PSC-Patienten

Neben pro-inflammatorischen Zellen ist auch die Funktion regulatorischer Zellen ein wichtiger Aspekt bei der Pathogenese von entzündlichen Erkrankungen. Foxp3+ regulatorische T-Zellen (Tregs) haben eine wichtige Rolle bei der Limitierung von Autoimmunerkrankungen und beim Schutz vor Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation²⁴⁰. Defekte in der Treg-Funktion wurden für Autoimmunerkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis²⁴¹ und der Multiplen Sklerose²⁴² beschrieben. Bei autoimmunen Lebererkrankungen wie z.B. der AIH wird die Rolle von Tregs kontrovers diskutiert. Während unsere Arbeitsgruppe im peripheren Blut von AIH-Patienten keinen signifikanten Unterschied in der Frequenz und Funktion von Tregs im Vergleich zu Gesunden feststellen konnte²⁴³, zeigten Longhi et al. eine verminderte Treg-Frequenz und eine beeinträchtigte suppressive Kapazität bei Patienten mit AIH⁶⁸.

Dass eine mögliche Störung der Immunregulation an der Pathogenese der PSC beteiligt sein könnte, wird durch genetische Studien zur PSC bekräftigt. Diese wiesen Polymorphismen in Genloci auf, die für den IL-2-Rezeptor und die Zytokine IL-2/IL-21 kodieren^{31,33,37,59} und Relevanz bei der Homöostase von Tregs besitzen. Tregs exprimieren im Vergleich zu aktivierten Effektor-T-Zellen große Mengen des IL-2-Rezeptors, so dass sie deren Proliferation durch erhöhte IL-2-Konsumierung regulieren können²⁴⁴. Interessanterweise entwickeln IL-2-Rezeptor-defiziente Mäuse ohne funktionelle Tregs eine Kolitis-assoziierte autoimmune Cholangitis, die starke Ähnlichkeit zur PSC hat¹¹⁸. In unserer Arbeitsgruppe konnten wir in Patienten mit PSC sowohl im peripheren Blut als auch intrahepatisch verminderte Treg-Frequenzen im Vergleich zu Kontrollkohorten detektieren. Die reduzierte Treg-Anzahl korrelierte signifikant mit Homozygotie im Hauptallel des PSC-assoziierten SNP "rs10905718" im *IL2-RA* Locus. Da die inhibitorische Funktion von Tregs aus dem peripheren Blut von PSC-Patienten beeinträchtigt zu sein schien⁴⁹, sollten in dieser Arbeit mögliche Mechanismen der verminderten suppressiven Kapazität aufgeklärt werden. Sowohl immunregulatorische

Zytokine als auch Zellkontakt-abhängige Mechanismen scheinen hierbei essentiell notwendig für die *in vivo* Treg-Funktion zu sein²⁴⁵. Es zeigte sich, dass PBMCs aus PSC-Patienten im Vergleich zu Kontrollgruppen signifikant weniger IL-10 produzierten (s. Abb. 22a), wobei dieser Prozess anscheinend nicht von einer assoziierten CED abhängig war (s. Abb. 22b). Die geringe IL-10 Konzentration in den Überständen der PBMCs von PSC-Patienten könnte das Resultat einer reduzierten Treg-Frequenz bzw. deren verminderter Funktionalität im peripheren Blut sein. Dieses Ergebnis korreliert mit ähnlichen Studien unserer Arbeitsgruppe, die zeigten, dass Tregs aus PSC-Patienten in *in vitro* Suppressorassays eine verminderte IL-10-Sekretion aufwiesen⁴⁹.

Neben der verminderten Sekretion von IL-10 könnte auch eine aberrante Expression regulatorischer Moleküle zur reduzierten Treg-Funktion bei der PSC beitragen. Die phänotypische Charakterisierung der Tregs zeigte bei den regulatorischen Molekülen CTLA-4, PD-1 und Tim-3 keine Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen (s. Abb. 23c-23f, 24a+b). Ein deutlicher Unterschied zeigte sich jedoch in der GARP-Expression. Sowohl die Anzahl GARP-exprimierender Tregs als auch die mittlere GARP-Expressionsstärke auf Tregs war bei der PSC im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bzw. gesunden Kontrollen vermindert (s. Abb. 23a+b). GARP wird spezifisch nur auf der Oberfläche stimulierter Tregs exprimiert¹⁴⁵ und bindet latentes TGF-B, welches sich aus den miteinander assoziierten Spaltprodukten des pro-TGF-β, LAP und reifem TGF-β, zusammensetzt^{146,147}. Erst nach Freisetzung von LAP kann das reife TGF- β seine biologische Aktivität entfalten¹⁴⁸. IL-2 scheint in humanen Tregs zur verstärkten GARP-Oberflächenexpression beizutragen²⁴⁶, wobei dies ein Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K)-abhängiger Mechanismus zu sein scheint²⁴⁷. Da Polymorphismen im Genlocus des IL-2-Rezeptors mit der PSC assoziiert sind, könnte eine gestörte IL-2-Rezeptorkaskade zur verminderten GARP-Expression bei der PSC beitragen. Um dies zu müsste die Aktivierung der PI3K-abhängigen Signalkaskade nach analysieren, IL-2-Stimulierung von Tregs untersucht werden. GARP-exprimierende Tregs scheinen in vitro im Vergleich zu Tregs ohne GARP-Expression eine gesteigerte suppressive Funktion aufzuweisen, die sowohl TGF- β - als auch IL-10-abhängig ist und mit der GARP-Expressionsstärke korreliert²⁴⁸. Die bei PSC-Patienten vorliegende verminderte IL-10-Sekretion der PBMCs (s. Abb. 22a) bzw. Tregs⁴⁹ könnte demnach auch von der reduzierten GARP-Expression abhängen. Eine verminderte Expression von GARP auf Tregs und damit einhergehend eine verminderte suppressive Kapazität der Tregs könnte somit zur PSC-Pathogenese beitragen. Inwieweit sich die im peripheren Blut detektierte verminderte IL-10-Sekretion und GARP-Oberflächenexpression auch auf PSC-Lebern übertragen lässt, bleibt zu spekulieren. Aus Gründen des Gewebemangels konnten diese Untersuchungen nicht mit Lebergewebe durchgeführt werden.

Auch die hohe Plastizität von CD4+ T-Zellen, die zu einer reziproken Beziehung zwischen Th17-Zellen und iTregs führt, könnte eine Rolle bei der PSC-Pathogenese spielen. iTregs können im pro-inflammatorischem Milieu den Th17-Phänotyp adaptieren, wobei dieser Prozess durch IL-1 β /IL-6 induziert und durch TGF- β inhibiert wird²⁴⁹. Da GARP-exprimierende CD4+ T-Zellen im Vergleich zu GARP defizienten T-Zellen im pro-inflammatorischem Milieu weniger IL-17-Sekretion aufweisen²⁴⁸, scheint GARP neben TGF- β ebenfalls einen inhibierenden Effekt auf die Th17-Konversion zu haben. Somit könnte es bei der PSC auf Grund erhöhter IL-1 β - und IL-6-Sekretion der PBMCs (s. Abb. 4+5) und verminderter GARP-Expression der Tregs (s. Abb. 23a+b) zur verstärkten Konversion von iTregs zu Th17-Zellen scheint auch an der Pathogenese weiterer humaner Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose²⁴² und des Morbus Crohn beteiligt zu sein¹¹². Der Einsatz *in vitro* induzierter Tregs zur Kontrolle von autoreaktiven Effektorzellen bei Autoimmunerkrankungen scheint daher auf Grund der starken Plastizität von iTregs und deren potentiellen Konversion zu Th17-Zellen hinterfragt werden zu müssen^{110,114}.

Als weitere wichtige regulatorische Zellpopulation wurde die Frequenz der von uns als Tr1-Zellen definierten Zellpopulation analysiert. Die Identifikation der Tr1-Zellen erfolgte aus technischen Gründen nicht über die co-Expression von CD49b und LAG-3²⁵⁰, so dass nicht sicher feststeht, ob es sich tatsächlich um die gleichen Zellen handelt wie sie durch Gagliani et al. beschrieben wurden²⁵⁰. Es stellte sich heraus, dass im Gegensatz zur Frequenz der Tregs, die Tr1-Frequenz bei der PSC im Vergleich zu den Kontrollgruppen unverändert war (s. Abb. 21). Ob es bei der PSC zu einer gestörten Funktionalität der stark IL-10-exprimierenden Tr1-Zellen^{129,130} kommt, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Hierfür könnten Tr1-Zellen aus PSC- und Kontrollpatienten isoliert und vergleichend hinsichtlich ihrer IL-10-Sekretion untersucht werden.

4.4 Charakterisierung der Apoptosesensitivität von T-Zellen im peripheren Blut von PSC-Patienten

Um eine bestehende Immunreaktion zu beenden ist neben der Kontrolle der Effektorzellen durch regulatorische Zellen auch die Apoptosefähigkeit von T-Zellen ein wichtiger immunregulatorischer Schritt¹⁶⁷. Für die PSC wird von uns eine verminderte Apoptosesensitivität von Effektor-T-Zellen als einer der pathogenetischen Mechanismen postuliert. Die Apoptose von Lymphozyten ist entscheidend für den Erhalt der Immunhomöostase und für das Abschalten von Entzündungsreaktionen. Defekte der Apoptose können zu Erkrankungen wie Autoimmunität und Krebs führen^{144,164,165}. Genomweite Assoziationsstudien zur PSC konnten Assoziationen mit Polymorphismen im BCL2L11-Locus, welcher für das pro-apoptotischen Bim kodiert, aufzeigen^{27,35}. Eine direkte Verbindung zwischen Erkrankungen der Gallengänge und Bim zeigten BCL2L11^{-/-}-Mäuse, die eine Infiltration mononukleärer Zellen um die intrahepatischen Gallengängen aufwiesen³¹. Bim scheint eine Schlüsselrolle bei der Induktion des programmierten T-Zelltodes zu haben, da es sowohl am extrinsischen Restimulierungs-induzierten Zelltod (RICD) als auch am Zytokinentzug-induzierten Zelltod (CWID) beteiligt zu sein scheint^{169,171}. RICD wird durch Restimulierung des T-Zellrezeptors während einer noch bestehenden Immunantwort induziert und verhindert eine überschießende Expansion der T-Zellen^{171,172}. Wenn die Konzentrationen an wachstumsfördernden Zytokinen wie IL-2 nach einer erfolgreichen adaptiven Immunantwort sinken, erfolgt durch den CWID die kontrollierte Kontraktion von T-Zellen¹⁸³. In dieser Arbeit wurde die Apoptosesensitivität aktivierter T-Zellen im peripheren Blut von Patienten mit PSC und PBC und Gesunden untersucht. Wir konnten zeigen, dass Patienten mit PSC im Vergleich zu den Kontrollgruppen eine signifikant verminderte Apoptoserate der CD4+ T-Zellen sowohl nach RICD als auch nach CWID aufwiesen (s. Abb. 25b+25d). Hingegen kam es bei der Apoptoserate der CD8+ T-Zellen zu keinen Unterschieden zwischen den untersuchten Gruppen, so dass die Apoptose der CD8+ T-Zellen bei PSC-Patienten nicht beeinträchtigt zu sein schien (s. Abb. 25c+25e). Um die zu Grunde liegenden Mechanismen der reduzierten Apoptoserate von CD4+ T-Zellen bei der PSC zu analysieren, wurde die Expression der pro-apoptotischen Moleküle Bim, Fas/Fas-Ligand und Bak und des anti-apoptotischen Bcl-2 nach Apoptoseinduktion durch RICD bzw. CWID in T-Zellen bestimmt. Es zeigte sich, dass die Hochregulierung der Bim-Expression in der PSC-Kohorte im Vergleich zu PBC- und gesunden Kontrollen nach Restimulierung des T-Zellrezeptors signifikant vermindert vorlag (s. Abb. 26a).

Die verminderte Hochregulierung der Bim-Expression nach RICD könnte zur verringerten Apoptosesensitivität der CD4+ T-Zellen in PSC-Patienten beitragen. Welcher Mechanismus bei der PSC zur reduzierten Apoptoserate der CD4+ T-Zellen nach IL-2-Deprivation beiträgt (s. Abb. 25d), bleibt zu klären. Die CWID-induzierte Bim-Expression zeigte 6 h nach IL-2-Entzug keine erkennbaren Unterschiede zwischen der PSC-, PBC- und Gesundkohorte (s. Abb. 27a). Da die Unterschiede in der Apoptoserate der CD4+ T-Zellen nach CWID zwischen den untersuchten Gruppen deutlich geringer ausfielen als nach RICD

(s. Abb. 25d+25b), könnten hier kaum detektierbare Unterschiede in der Bim-Expression involviert sein. Vielleicht war der Zeitpunkt der Zellernte 6 h nach CWID-Apoptoseinduktion zur kurz gewählt, um Unterschiede in der Regulation von Bim durch IL-2-Deprivation zwischen den Gruppen erkennen zu können. Die Regulation der Bim-Expression erfolgt beim CWID über die IL-2-Rezeptor-abhängige Aktivierung der Ras/ERK Kinase. Ist IL-2 vorhanden, führt dies zur Degradierung des Bim-Proteins und zur Destabilisierung der Bim-RNA¹⁹². In Patienten mit einer neuen Form des autoimmunen lymphoproliferativen Syndroms (ALPS) kommt es trotz Entzug von IL-2 zu einer konstitutiven Aktivierung von Ras/ERK, was wiederum die Bim-Expression dauerhaft reduziert²⁵¹.

In weiteren Analysen soll untersucht werden, ob auch leberinfiltrierende CD4+ T-Lymphozyten aus PSC-Patienten im Vergleich zu Kontrollen eine verminderte Apoptoserate nach RICD und CWID aufweisen. Es bleibt außerdem zu klären, ob Polymorphismen im *BCL2L11*-Locus bei den PSC-Patienten am reduzierten CD4+ T-Zellverlust nach RICD und CWID und an der reduzierten Hochregulierung von Bim nach Restimulierung beteiligt sind. Die in diese Studie eingeschlossenen PSC-Patienten sind für SNP-Analysen im *BCL2L11*-Locus vorgesehen.

Da die Expression von Bak und Bcl-2 zwischen den untersuchten Gruppen sowohl nach Restimulierung (s.Abb. 26c+26d) als auch nach IL-2-Deprivation (s. Abb. 27c+27d) gleich ausfiel, schienen diese Proteine nicht an der verminderten CD4+ T-Zellapoptose bei der PSC beteiligt zu sein. Auch das pro-apoptotische Protein Fas-Ligand, das anscheinend essentiell am RICD beteiligt ist¹⁸⁰, scheint keine Rolle beim reduzierten Zellverlust der CD4+ T-Zellen von PSC-Patienten zu spielen, da auch hier nach Restimulierung der T-Zellen zwischen den analysierten Gruppen keine Unterschiede im Expressionsniveau von Fas-Ligand zu erkennen waren (s. Abb. 26b). Dass Fas/Fas-Ligand keine Rolle bei der T-Zellapoptose durch IL-2-Entzug zu spielen scheint, wurde bereits durch Studien anderer Arbeitsgruppen belegt^{164,171}. Wir konnten nach Induktion des CWIDs signifikante Unterschiede im Expressionsniveau von Fas-Ligand zwischen PSC- und PBC-Patienten aufzeigen (s. Abb. 27b), die vermutlich zu vernachlässigen sind, da das Expressionsniveau von Fas-Ligand nach CWID nahezu unverändert zu T-Zellen ohne Apoptoseinduktion war.

Bei der PSC wird vermutet, dass eine verminderte T-Zellapoptose zu einer gesteigerten Immunreaktion in der Leber führt. Dazu passend wurde gezeigt, dass Patienten mit immunologischen Lebererkrankungen wie der PSC eine erhöhte VCAM-1-Expression in den Gallengängen aufweisen. VCAM-1 scheint wiederum einen inhibitorischen Einfluss auf die Apoptose leberinfiltrierender T-Zellen zu haben, was zur Persistenz der Leberentzündung führen kann und somit die Entstehung einer chronischen Hepatitis begünstigt. Hierbei scheint die Inhibition der Apoptose durch Bindung von VCAM-1 an das $\alpha 4\beta$ 1-Integrin auf den T-Zellen und der anschließenden Akkumulation des anti-apoptotischen Bcl-2 in den T-Zellen zu erfolgen²⁵². Da VCAM-1 auf Endothelzellen exprimiert wird²⁵³, scheint dieser Prozess nicht an der von uns detektierten verminderten Apoptoserate der CD4+ T-Zellen im peripheren Blut von +PSC-Patienten nach *in vitro* Induktion von RICD und CWID beteiligt zu sein. Eine weitere Studie zeigte, dass Patienten mit PSC im Vergleich zu hepatozellulären Karzinompatienten, die als Kontrollen dienten, eine verminderte Caspase-3-Rate im Lebergewebe aufwiesen. Dies stand im Gegensatz zu den cholestatischen PBC-Patienten, bei denen im Vergleich zur PSC eine verstärkte Apoptoserate des Lebergewebes festgestellt wurde²⁵⁴. Dies lässt vermuten, dass die verminderte Apoptoserate in der PSC nicht auf Grund

wurde^{2,34}. Dies lasst vermuten, dass die verminderte Apoptoserate in der PSC nicht auf Grund der Cholestase vorliegt, sondern Krankheits-spezifisch sein könnte²⁵⁴. Ob in den von uns untersuchten T-Zellen im peripheren Blut von PSC-Patienten auch eine reduzierte Caspase-3-Expression nach Induktion von RICD und CWID vorlag, wurde nicht weiter untersucht, ist aber auf Grund der reduzierten Bim-Expression nach Restimulierung des T-Zellrezeptors wahrscheinlich.

Ein zusätzlicher Mechanismus der verminderten Apoptosesensitivität von CD4+ T-Zellen im peripheren Blut von PSC-Patienten könnte eine reduzierte initiale Aktivierung der T-Zellen nach T-Zellrezeptorspezifischer Stimulierung¹⁷³ durch eine verringerte CD28-Expression auf CD4+ T-Zellen sein. Es konnte bereits gezeigt werden, dass im peripheren Blut von PSC-Patienten vermehrt CD4+CD28- T-Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten vorkommen und dass im Lebergewebe von PSC-Patienten eine signifikant gesteigerte Infiltration von CD4+CD28- T-Lymphozyten im Vergleich zu Kontrollgruppen (Gesund, PBC, NASH) vorliegt²⁵⁵. Diese CD28-defizienten T-Zellen, die bei PSC-Patienten um die Gallengänge herum lokalisiert sind, produzieren verstärkt IFNy und TNFa und fördern somit die Gewebeentzündung²⁵⁵. Auch genetische Assoziationsstudien zur PSC belegen einen potentiellen Einfluss des immunregulatorischen Proteins CD28 auf die PSC-Pathogenese³³. Um zu verifizieren, ob bei der PSC eine verminderte CD28-Expression von CD4+ T-Zellen im Zusammenhang mit der von uns im peripheren Blut detektierten verminderten Apoptoserate von CD4+ T-Zellen nach RICD und CWID steht, könnte im peripheren Blut die CD28-Expression von CD4+ T-Zellen bei PSC-Patienten und Vergleichsgruppen nach initialer T-Zellaktivierung mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 und nach finaler Induktion von RICD und CWID durchflusszytometrisch bestimmt werden. Hierbei könnte zudem der Aktivierungszustand dieser Zellen durch Expressionsanalysen von CD25 und CD69 untersucht werden¹⁷³.

Zusammenfassend scheint eine verminderte Apoptose der T-Zellen durch Defekte im pro-apoptotischen Bim, eine erhöhte Expression von VCAM-1 in den Gallengängen der Patienten und eine verminderten Expression von CD28 auf CD4+ T-Zellen ein möglicher Mechanismus der Enstehung der Primär Sklerosierenden Cholangitis zu sein, welcher die Entzündungsreaktion auf die Gallengänge und die Leber begrenzen könnte²⁵². Da der CWID auch einer der immunsuppressiven Mechanismen von Tregs ist, bleibt noch zu klären, inwieweit die verminderte Apoptoserate nach Entzug von IL-2 im Zusammenhang mit der reduzierten suppressiven Kapazität der Tregs in PSC-Patienten steht⁴⁹. Um dies zu analysieren, könnte man die Apoptoserate von CD4+ Effektorzellen in co-Kultur mit Tregs unter Ausschluss von IL-2 bestimmen.

4.5 Ausblick

a) Untersuchung der Expression pro-inflammatorischer Zytokine im peripheren Blut von PSC-Patienten

Voruntersuchungen weisen auf Grund der erhöhten Anzahl IL-17-produzierender Lymphozyten in den Portalfeldern von PSC-Lebern⁵⁰ auf eine vermehrte Rekrutierung dieser Zellen zu den Gallengängen hin. Zudem zeigten Studien, dass es bei der PSC zur vermehrten Produktion von CCL20 durch BECs kommt²²³. CCL20 ist durch die Interaktion mit CCR6 auf den Oberflächen aktivierter Th17-Zellen¹¹³ maßgeblich an deren Rekrutierung zu den Gallengängen beteiligt²²³. Um zu analysieren, ob es bei der PSC zur vermehrten Migration von Th17-Zellen zur Leber kommt, könnte bei PSC-Patienten und Kontrollgruppen die Expressionsstärke von CCR6 auf aktivierten Th17-Zellen untersucht werden. Da Th17-Zellen über die CXCR3/CXCL9-11 Interaktion das sinusoidale Endothel passieren und in die Leber migrieren können^{223,224}, könnte zudem die Expression von CXCR3 auf aktivierten Th17-Zellen im Vergleich zu Kontrollen untersucht werden. Zusätzlich könnte die hepatische Expression der Chemokine CCL20 und CXCL9-11 für PSC-Patienten und Vergleichsgruppen bestimmt werden. In dieser Arbeit konnten wir bereits zeigen, dass der Kontakt mit pathogenen Keimen bei PSC-Patienten im Vergleich zu Kontrollgruppen zu einer gesteigerten Sekretion von IL-1 β und IL-6 durch PBMCs führte. Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob aus PSC-Lebern isolierte BECs nach Pathogenkontakt auch vermehrt pro-inflammatorische Zytokine produzieren, die wiederum die intrahepatische Th17-Konversion fördern könnten. Zudem könnte versucht werden, die *in vitro* Konversionsfähigkeit peripherer CD4+ T-Zellen zu Th17-Zellen bei PSC-Patienten und Vergleichsgruppen zu bestimmen, um so Rückschlüsse auf ihre *in vivo* Differenzierung zu Th17-Zellen ziehen zu können. Für die PSC sollte außerdem weiter geklärt werden, ob die gesteigerte Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine nach Pathogenstimulation und die erhöhte periphere Th17-Zellfrequenz von einer Keimbesiedlung der Gallengänge abhängt. Hierfür soll die Gruppengröße der analysierten PSC-Kohorte mit bakteriellen Cholangitiden vergrößert werden.

Um mögliche Mechanismen der gesteigerten Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine durch PBMCs nach Pathogenstimuation bei PSC-Patienten zu identifizieren, sollten weiterhin funktionelle Analysen der TLR-Signaltransduktion erfolgen. Hierfür könnten PBMCs aus PSC-Patienten und Kontrollgruppen in Zellkulturexperimenten mit pathogenen Keimen stimuliert werden und über Expressionsstudien NF- κ B-gesteuerte Zielgene untersucht werden, zu denen viele pro-inflammatorische Zytokine gehören. Zudem sollten mögliche Adaptermoleküle der TLR-Signaltransduktion wie die inhibitorischen Moleküle SIGIRR (single-immunoglobulin interleukin-1 receptorrelated) und IRAK-M (interleukin-1 receptor-associated kinase mono-myelocytic) untersucht werden. Da Genomweite Assoziationsstudien zur PSC Assoziationen mit Polymorphismen im Genlocus von *REL* aufwiesen³⁷, soll auch die nukleäre Translokation der DNA-bindenden NF κ B-Untereinheiten p65 (RelA) und c-Rel analysiert werden.

Ob Polymorphismen im Genlocus von *REL*, *CARD9*, *IL-21* und *Fut2* bei der gesteigerten Sekretion Th17-induzierender Zytokine und der erhöhten Th17-Frequenz im peripheren Blut und in den Lebern von PSC-Patienten involviert sind, soll durch SNP-Analysen der in die Studie eingeschlossenen Patienten ermittelt werden.

b) Charakterisierung der leukozytären Zellzusammensetzung im peripheren Blut von PSC-Patienten

In dieser Arbeit wurde bereits die Zellzusammensetzung der Leukozyten im peripheren Blut von PSC-Patienten und Kontrollgruppen untersucht. Um Aussagen über den Zustand in PSC-Lebern machen zu können, sollen diese Analysen auch mit Biopsiematerial erfolgen. Außerdem soll durchflusszytometrisch identifiziert werden, ob es sich bei der gesteigerten Anzahl IL-17-produzierender Zellen in PSC-Lebern um Th17-Zellen oder MAIT-Zellen handelt. Hierfür könnten Leberzellen mit $\label{eq:pma} PMA/Ionomycin stimuliert werden und dann über ihre Expression von CD3+CD4+IL-17+ als Th17 bzw. von CD3+V\alpha7.2+CD161+IL-17+ als IL-17-produzierende MAIT-Zellen identifiziert werden.$

c) Charakterisierung regulatorischer Zellen und Moleküle im peripheren Blut von PSC-Patienten

In dieser Arbeit konnten wir bereits zeigen, dass Tregs aus PSC-Patienten im Vergleich zu Kontrollen nach Stimulierung mit IL-2 reduzierte Mengen des immunregulatorischen Moleküls GARP auf ihren Oberflächen exprimieren. Zudem sollen weitere Phänotypisierung der Tregs durch Expressionsbestimmung von CD39, CD73, CD28, RORc und Foxp3 bei PSC-Patienten und Kontrollgruppen erfolgen.

Da humane CD4+ T-Zellen eine hohe Plastizität besitzen und in Gegenwart von IL-2 und TGF- β zu iTregs konvertieren können¹¹⁰, könnte die *in vitro* Konversionsfähigkeit von naiven CD4+ T-Zellen zu iTregs in PSC-Patienten und gesunden Kontrollen bestimmt werden.

d) Charakterisierung der Apoptosesensitivität von T-Zellen im peripheren Blut von PSC-Patienten

Die zu Grunde liegenden Mechanismen der im peripheren Blut vorliegenden verminderten Apoptoserate von CD4+ T-Zellen bei PSC-Patienten im Vergleich zu Kontrollgruppen nach RICD und CWID sollten genauer untersucht werden. Hierfür könnte bestimmt werden, ob es bei der PSC zur dauerhaften Aktivierung der Ras/ERK Kinase kommt, die die Bim-Expression reduzieren und somit anti-apoptotisch wirken könnte. Außerdem soll untersucht werden, ob die verminderte Apoptoserate der CD4+ T-Zellen aus einer reduzierten initialen Aktivierung des T-Zellrezeptors bei PSC-Patienten resultiert. Hierfür sollen im peripheren Blut CD4+ T-Zellen initial mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 aktiviert werden, um dann die Proliferation der CD4+ T-Zellen und deren Oberflächenexpression von Aktivierungsmarkern wie CD25 und CD69 bei PSC-Patienten im Vergleich zu Kontrollen zu bestimmen¹⁷³. Ergänzend hierzu soll im peripheren Blut die CD28-Expression von CD4+ T-Zellen nach initialer Aktivierung und nach RICD und CWID bei PSC-Patienten und Kontrollgruppen durchflusszytometrisch untersucht werden.

Es sollte zudem analysiert werden, ob die im Vergleich zu Kontrollgruppen nach CWID im peripheren Blut detektierte verminderte Apoptoserate von CD4+ T-Zellen aus PSC-Patienten mit der reduzierten *in vitro* suppressiven Kapazität von Tregs aus PSC-Patienten zusammenhängt. Um dies zu untersuchen, soll im peripheren Blut die Apoptoserate von CD4+ Effektor-T-Zellen nach co-Kultur mit Tregs unter Ausschluss von IL-2 bei Patienten mit PSC und Kontrollgruppen bestimmt werden.

Ob Polymorphismen im *BCL2L11*-Locus bei PSC-Patienten zum reduzierten T-Zellverlust nach RICD und CWID und zum reduzierten Bim-Expressionsniveau beitragen, soll durch SNP-Analysen der in diese Studie eingeschlossenen PSC-Patienten analysiert werden.

5 Zusammenfassung

Die Immunpathogenese der cholestatischen autoimmunen Lebererkrankung PSC ist bisher weitgehend unklar. Dies ist einer der Gründe, warum es bisher nur eine unzureichende medikamentöse Therapie gibt, die den progressiven Verlauf der Erkrankung nicht aufhalten kann⁶. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung immunologischer Prozesse, die an der Pathogenese der PSC beteiligt sein könnten. Es wurden experimentelle Ansätze verfolgt, die auf unseren Vorarbeiten zum Ungleichgewicht zwischen Immunzellaktivierung und Immunzellregulierung und den genetischen Assoziationsstudien zur PSC aufbauten.

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten wir zeigen, dass die Interaktion zwischen Keimen und Immunzellen eine Rolle bei der Pathogenese der PSC zu spielen scheint, da wir in der Galle von PSC-Patienten eine erhöhte Keimlast detektieren konnten. Desweiteren lag nach Pathogenstimulation von peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) bei PSC-Patienten im Vergleich zu Kontrollgruppen eine erhöhte Th17-Zellantwort vor⁵⁰. Im Rahmen dieser Arbeit sollten mögliche Mechanismen identifiziert werden, die zur aberranten Th17-Zellaktivierung nach Pathogenkontakt beitragen könnten. Es zeigte sich, dass PBMCs aus PSC-Patienten im Vergleich zu Kontrollgruppen signifikant mehr IL-1β-Sekretion nach Stimulierung mit den Pathogenen C.albicans, E.faecalis und S.aureus aufwiesen. IL-1ß ist essentiell für die humane Th17-Differenzierung und kann zusammen mit IL-6 die IL-17-Produktion in CD4+ T-Zellen induzieren^{103,202}. Auch die IL-6-Sekretion war bei PSC-Patienten im Vergleich zu Gesunden nach Stimulierung mit C.albicans und E.faecalis signifikant erhöht. Zudem fanden wir, dass im peripheren Blut die Frequenz von Th17-Zellen und die IL-17-Sekretion von PBMCs bei PSC-Patienten im Vergleich zu den untersuchten Kontrollgruppen per se signifikant verstärkt vorlagen. Somit könnte die verstärkte Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine nach Pathogenkontakt sowie die erhöhte Frequenz IL-17-produzierender Zellen im peripheren Blut auf eine gestörte in vivo T-Zelldifferenzierung bei der PSC hinweisen.

Auch eine verstärkte Rekrutierung antimikrobieller MAIT-Zellen in die Leber könnte an der Pathogenese der PSC beteiligt sein. Unsere Untersuchungen von MAIT-Zellen im peripheren Blut zeigten, dass deren Frequenz bei allen in dieser Arbeit untersuchten Leber- bzw. Darmentzündungen im Vergleich zu Gesunden signifikant vermindert vorlag.

Die Regulierung von Entzündungsreaktionen scheint bei PSC-Patienten beeinträchtigt zu sein. Hierauf weisen Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe hin, die zeigten, dass PSC-Patienten im Vergleich zu Kontrollgruppen sowohl in der Leber als auch im peripheren Blut reduzierte Treg-Frequenzen aufwiesen und dass die *in vitro* suppressive Kapazität von Tregs im peripheren Blut vermindert war⁴⁹. Um die von uns postulierte Störung der Immunregulation bei der PSC weiter zu untersuchen, erfolgte in der vorliegenden Arbeit eine Sekretionsanalyse des immunregulatorischen Zytokins IL-10 sowie eine phänotypische Charakterisierung von Tregs. Wir konnten hierbei zeigen, dass PBMCs aus Patienten mit PSC im Vergleich zu Kontrollgruppen signifikant weniger IL-10 produzierten. Zudem wiesen Tregs aus PSC-Patienten im Vergleich zu Kontrollen eine verminderte Expression des immunregulatorischen Moleküls GARP im peripheren Blut auf.

Da neben der Kontrolle von Effektorzellen durch regulatorische Zellen die Apoptosefähigkeit von Lymphozyten ein wichtiger immunregulatorischer Schritt ist¹⁶⁷, wurde die Apoptosesensitivität von aktivierten T-Zellen bei PSC-Patienten im Vergleich zu Kontrollgruppen im peripheren Blut untersucht. Es zeigte sich, dass CD4+ T-Zellen aus PSC-Patienten eine verminderte Apoptoserate nach Apoptoseinduktion durch RICD und CWID aufwiesen. Expressionsanalysen ergaben, dass nach RICD eine verminderte Hochregulierung des pro-apoptotischen Moleküls Bim bei PSC-Patienten im Vergleich zu Kontrollen erfolgte. Somit könnte eine dysfunktionelle Apoptose von Lymphozyten einen weiteren möglichen pathogenetischen Mechanismus der PSC darstellen. Hierauf weisen auch genetische Studien zur PSC hin, die Assoziationen der PSC zu Polymorphismen im *BCL2L11*-Locus, welcher Bim kodiert, aufwiesen^{27,35}.

Zusammenfassend unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unsere Hypothese, dass es bei der PSC anscheinend zu einer Dysbalance zwischen Immunzellaktivierung und Immunzellregulierung kommt und eine fehlgesteuerte Aktivierung von Lymphozyten zur Pathogenese der PSC beitragen könnte.

6 Abstract

Today the immunopathogenesis of primary sclerosing cholangitis (PSC) remains largely elusive resulting in a lack of suitable therapeutics for the treatment of the disease⁶. We here aim to investigate the immunological processes that may be involved in the pathogenesis of PSC. This study is based on the recent findings of genetic studies and on our previous investigations, where we observed an imbalance between the activation and regulation of immune cells in patients with PSC.

As shown by our previous work bile fluid of patients with PSC is frequently colonized with pathogens. In addition, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with PSC showed increased Th17 response after stimulation with pathogens⁵⁰. Therefore, a dysregulated immune response upon microbial stimulation may be involved in PSC pathogenesis. In this study we aim to identify the underlying mechanisms leading to an aberrant activation of Th17 cells after stimulation with pathogens. We have shown that PBMCs from patients with PSC produced significantly higher levels of IL-1B after stimulation with *C.albicans*, *E.faecalis* and S.aureus compared to control groups. IL-1 β is the essential factor of human Th17 cell differentiation. Together with IL-6, IL-1 β can induce IL-17 production in CD4+ T cells^{103,202}. IL-6 secretion in PSC was also significantly increased compared to healthy controls after stimulation with C.albicans and E.faecalis. Furthermore, we could demonstrate that patients with PSC showed significantly higher frequencies of Th17 cells in peripheral blood compared to control groups. Accordingly, production of IL-17 in PBMCs from patients with PSC was also significantly increased in comparison to control groups. Thus, enhanced secretion of proinflammatory cytokines after microbial stimulation as well as elevated frequencies of Th17 cells in peripheral blood could indicate an impaired differentiation of T cells in patients with PSC in vivo.

An increased recruitment of antimicrobial MAIT cells to the liver could also participate in pathogenesis of PSC. Our observations showed significantly reduced frequencies of MAIT cells in peripheral blood of patients with liver inflammation as well as inflammatory bowel disease compared to healthy controls.

The regulation of immune cells seems to be impaired in patients with PSC. This is suggested by our previous observations showing reduced Treg numbers in the liver as well as in the peripheral blood of patients with PSC compared to control groups. In comparison to control groups our preliminary observations also demonstrated a diminished suppressive capacity of Tregs isolated from peripheral blood of patients with PSC *in vitro*⁴⁹. To further analyse a

possible impairement of immune cell regulation in PSC we here investigated the secretion of the immune regulatory cytokine IL-10 and characterized Tregs by their expression of phenotypical markers. We demonstrated that PBMCs from patients with PSC produced significantly reduced amounts of IL-10 compared to controls. In addition, Tregs isolated from patients with PSC showed a diminished expression of immune regulatory molecule GARP. Beside the regulation of effector T cells by Tregs, programmed cell death of activated lymphocytes via apoptosis remains an essential process to sustain immune homeostasis¹⁶⁷. Therefore, activated T cells derived from patients with PSC and control groups were tested for sensitivity to apoptosis triggered by extrinsic RICD and intrinsic CWID. Compared to controls, CD4+ T cells from patients with PSC exhibited a significant reduction of cell loss after induction of apoptosis by RICD and CWID. Furthermore, expression assays revealed a diminished up-regulation of proapoptotic Bim after RICD in patients with PSC compared to control groups. Thus, defective apoptosis of activated T cells might contribute to the pathogenesis of PSC. This is confirmed by recent genetic studies demonstrating polymorphisms in a locus encoding for Bim^{27,35}.

In conclusion, these findings confirm our suggestion that patients with PSC might exhibit a dysbalance between activation and regulation of immune cells and that a defective lymphocyte activation might contribute to the pathogenesis of PSC.

7 Literaturverzeichnis

- Washington, M. K. Autoimmune liver disease: overlap and outliers. *Modern pathology* : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc 20 Suppl 1, S15-30, doi:10.1038/modpathol.3800684 (2007).
- Eaton, J. E., Talwalkar, J. A., Lazaridis, K. N., Gores, G. J. & Lindor, K. D. Pathogenesis of primary sclerosing cholangitis and advances in diagnosis and management. *Gastroenterology* 145, 521-536, doi:10.1053/j.gastro.2013.06.052 (2013).
- 3 Aron, J. H. & Bowlus, C. L. The immunobiology of primary sclerosing cholangitis. *Seminars in immunopathology* **31**, 383-397, doi:10.1007/s00281-009-0154-7 (2009).
- 4 Chapman, R. & Cullen, S. Etiopathogenesis of primary sclerosing cholangitis. *World journal of gastroenterology : WJG* **14**, 3350-3359 (2008).
- 5 Hirschfield, G. M., Karlsen, T. H., Lindor, K. D. & Adams, D. H. Primary sclerosing cholangitis. *Lancet* **382**, 1587-1599, doi:10.1016/S0140-6736(13)60096-3 (2013).
- 6 European Association for the Study of the, L. EASL Clinical Practice Guidelines: management of cholestatic liver diseases. *Journal of hepatology* **51**, 237-267, doi:10.1016/j.jhep.2009.04.009 (2009).
- 7 Chapman, R. *et al.* Diagnosis and management of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* **51**, 660-678, doi:10.1002/hep.23294 (2010).
- 8 Portmann, B. & Zen, Y. Inflammatory disease of the bile ducts-cholangiopathies: liver biopsy challenge and clinicopathological correlation. *Histopathology* **60**, 236-248, doi:10.1111/j.1365-2559.2011.03853.x (2012).
- 9 Boonstra, K., Beuers, U. & Ponsioen, C. Y. Epidemiology of primary sclerosing cholangitis and primary biliary cirrhosis: a systematic review. *Journal of hepatology* 56, 1181-1188, doi:10.1016/j.jhep.2011.10.025 (2012).
- 10 Molodecky, N. A. *et al.* Incidence of primary sclerosing cholangitis: a systematic review and meta-analysis. *Hepatology* **53**, 1590-1599, doi:10.1002/hep.24247 (2011).
- 11 Lindkvist, B., Benito de Valle, M., Gullberg, B. & Bjornsson, E. Incidence and prevalence of primary sclerosing cholangitis in a defined adult population in Sweden. *Hepatology* 52, 571-577, doi:10.1002/hep.23678 (2010).
- 12 Karlsen, T. H., Schrumpf, E. & Boberg, K. M. Genetic epidemiology of primary sclerosing cholangitis. *World journal of gastroenterology : WJG* **13**, 5421-5431 (2007).

- 13 Broome, U. *et al.* Natural history and prognostic factors in 305 Swedish patients with primary sclerosing cholangitis. *Gut* **38**, 610-615 (1996).
- 14 Karlsen, T. H. & Boberg, K. M. Update on primary sclerosing cholangitis. *Journal of hepatology* 59, 571-582, doi:10.1016/j.jhep.2013.03.015 (2013).
- 15 Himmel, M. E., Hardenberg, G., Piccirillo, C. A., Steiner, T. S. & Levings, M. K. The role of T-regulatory cells and Toll-like receptors in the pathogenesis of human inflammatory bowel disease. *Immunology* **125**, 145-153, doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02939.x (2008).
- Burak, K. *et al.* Incidence and risk factors for cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *The American journal of gastroenterology* **99**, 523-526, doi:10.1111/j.1572-0241.2004.04067.x (2004).
- 17 Bergquist, A., Glaumann, H., Persson, B. & Broome, U. Risk factors and clinical presentation of hepatobiliary carcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis: a case-control study. *Hepatology* 27, 311-316, doi:10.1002/hep.510270201 (1998).
- 18 Bo, X., Broome, U., Remberger, M. & Sumitran-Holgersson, S. Tumour necrosis factor alpha impairs function of liver derived T lymphocytes and natural killer cells in patients with primary sclerosing cholangitis. *Gut* 49, 131-141 (2001).
- 19 Xu, B., Broome, U., Ericzon, B. G. & Sumitran-Holgersson, S. High frequency of autoantibodies in patients with primary sclerosing cholangitis that bind biliary epithelial cells and induce expression of CD44 and production of interleukin 6. *Gut* 51, 120-127 (2002).
- 20 Hov, J. R., Boberg, K. M. & Karlsen, T. H. Autoantibodies in primary sclerosing cholangitis. *World journal of gastroenterology : WJG* **14**, 3781-3791 (2008).
- 21 Grant, A. J. *et al.* 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**, 1445-1455, doi:10.1016/S0002-9440(10)62570-9 (2002).
- 22 Dave, M., Elmunzer, B. J., Dwamena, B. A. & Higgins, P. D. Primary sclerosing cholangitis: meta-analysis of diagnostic performance of MR cholangiopancreatography. *Radiology* 256, 387-396, doi:10.1148/radiol.10091953 (2010).
- 23 Alabraba, E. *et al.* A re-evaluation of the risk factors for the recurrence of primary sclerosing cholangitis in liver allografts. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* **15**, 330-340, doi:10.1002/lt.21679 (2009).

- 24 Chapman, R. W. High-dose ursodeoxycholic acid in the treatment of primary sclerosing cholangitis: throwing the urso out with the bathwater? *Hepatology* **50**, 671-673, doi:10.1002/hep.23174 (2009).
- 25 Pollheimer, M. J., Halilbasic, E., Fickert, P. & Trauner, M. Pathogenesis of primary sclerosing cholangitis. *Best practice & research. Clinical gastroenterology* 25, 727-739, doi:10.1016/j.bpg.2011.10.009 (2011).
- 26 Bergquist, A. *et al.* Increased risk of primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis in first-degree relatives of patients with primary sclerosing cholangitis. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* **6**, 939-943, doi:10.1016/j.cgh.2008.03.016 (2008).
- 27 Mells, G. F., Kaser, A. & Karlsen, T. H. Novel insights into autoimmune liver diseases provided by genome-wide association studies. *Journal of autoimmunity* **46**, 41-54, doi:10.1016/j.jaut.2013.07.004 (2013).
- 28 Spurkland, A. *et al.* HLA class II haplotypes in primary sclerosing cholangitis patients from five European populations. *Tissue antigens* **53**, 459-469 (1999).
- Ellinghaus, D. *et al.* Genome-wide association analysis in primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis identifies risk loci at GPR35 and TCF4. *Hepatology* 58, 1074-1083, doi:10.1002/hep.25977 (2013).
- 31 Melum, E. *et al.* Genome-wide association analysis in primary sclerosing cholangitis identifies two non-HLA susceptibility loci. *Nature genetics* **43**, 17-19, doi:10.1038/ng.728 (2011).
- 32 Folseraas, T., Melum, E., Franke, A. & Karlsen, T. H. Genetics in primary sclerosing cholangitis. *Best practice & research. Clinical gastroenterology* 25, 713-726, doi:10.1016/j.bpg.2011.09.010 (2011).
- 33 Liu, J. Z. *et al.* Dense genotyping of immune-related disease regions identifies nine new risk loci for primary sclerosing cholangitis. *Nature genetics* 45, 670-675, doi:10.1038/ng.2616 (2013).
- 34 Hov, J. R. *et al.* Mutational characterization of the bile acid receptor TGR5 in primary sclerosing cholangitis. *PloS one* **5**, e12403, doi:10.1371/journal.pone.0012403 (2010).

- 35 Naess, S., Shiryaev, A., Hov, J. R., Franke, A. & Karlsen, T. H. Genetics in primary sclerosing cholangitis. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology* 36, 325-333, doi:10.1016/j.clinre.2012.02.003 (2012).
- Folseraas, T. *et al.* Extended analysis of a genome-wide association study in primary sclerosing cholangitis detects multiple novel risk loci. *Journal of hepatology* 57, 366-375, doi:10.1016/j.jhep.2012.03.031 (2012).
- Janse, M. *et al.* Three ulcerative colitis susceptibility loci are associated with primary sclerosing cholangitis and indicate a role for IL2, REL, and CARD9. *Hepatology* 53, 1977-1985, doi:10.1002/hep.24307 (2011).
- 38 Iliev, I. D. *et al.* Interactions between commensal fungi and the C-type lectin receptor Dectin-1 influence colitis. *Science* **336**, 1314-1317, doi:10.1126/science.1221789 (2012).
- 39 O'Mahony, C. A. & Vierling, J. M. Etiopathogenesis of primary sclerosing cholangitis. *Seminars in liver disease* **26**, 3-21, doi:10.1055/s-2006-933559 (2006).
- 40 Eksteen, B. *et al.* Hepatic endothelial CCL25 mediates the recruitment of CCR9+ guthoming lymphocytes to the liver in primary sclerosing cholangitis. *The Journal of experimental medicine* **200**, 1511-1517, doi:10.1084/jem.20041035 (2004).
- Grant, A. J., Lalor, P. F., Hubscher, S. G., Briskin, M. & Adams, D. H. MAdCAM-1 expressed in chronic inflammatory liver disease supports mucosal lymphocyte adhesion to hepatic endothelium (MAdCAM-1 in chronic inflammatory liver disease). *Hepatology* 33, 1065-1072, doi:10.1053/jhep.2001.24231 (2001).
- 42 Grant, A. J., Lalor, P. F., Salmi, M., Jalkanen, S. & Adams, D. H. Homing of mucosal lymphocytes to the liver in the pathogenesis of hepatic complications of inflammatory bowel disease. *Lancet* **359**, 150-157, doi:10.1016/S0140-6736(02)07374-9 (2002).
- Eksteen, B. *et al.* Gut homing receptors on CD8 T cells are retinoic acid dependent and not maintained by liver dendritic or stellate cells. *Gastroenterology* 137, 320-329, doi:10.1053/j.gastro.2009.02.046 (2009).
- Borchers, A. T., Shimoda, S., Bowlus, C., Keen, C. L. & Gershwin, M. E. Lymphocyte recruitment and homing to the liver in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Seminars in immunopathology* **31**, 309-322, doi:10.1007/s00281-009-0167-2 (2009).
- 45 Liaskou, E. *et al.* Regulation of mucosal addressin cell adhesion molecule 1 expression in human and mice by vascular adhesion protein 1 amine oxidase activity. *Hepatology* 53, 661-672, doi:10.1002/hep.24085 (2011).

- 46 Salmi, M., Kalimo, K. & Jalkanen, S. Induction and function of vascular adhesion protein-1 at sites of inflammation. *The Journal of experimental medicine* **178**, 2255-2260 (1993).
- 47 Fickert, P., Moustafa, T. & Trauner, M. Primary sclerosing cholangitis--the arteriosclerosis of the bile duct? *Lipids in health and disease* **6**, 3, doi:10.1186/1476-511X-6-3 (2007).
- 48 Beuers, U. *et al.* The biliary HCO(3)(-) umbrella: a unifying hypothesis on pathogenetic and therapeutic aspects of fibrosing cholangiopathies. *Hepatology* **52**, 1489-1496, doi:10.1002/hep.23810 (2010).
- 49 Sebode, M. *et al.* Reduced FOXP3 regulatory T cells in patients with primary sclerosing cholangitis are associated with IL2RA gene polymorphisms. *Journal of hepatology*, doi:10.1016/j.jhep.2013.12.027 (2014).
- 50 Katt, J. *et al.* Increased T helper type 17 response to pathogen stimulation in patients with primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* **58**, 1084-1093, doi:10.1002/hep.26447 (2013).
- 51 Bogdanos, D. P. & Gershwin, M. E. What is new in primary biliary cirrhosis? *Digestive diseases* **30 Suppl 1**, 20-31, doi:10.1159/000341118 (2012).
- 52 Hirschfield, G. M. & Gershwin, M. E. The immunobiology and pathophysiology of primary biliary cirrhosis. *Annual review of pathology* **8**, 303-330, doi:10.1146/annurev-pathol-020712-164014 (2013).
- 53 Gershwin, M. E. & Mackay, I. R. The causes of primary biliary cirrhosis: Convenient and inconvenient truths. *Hepatology* **47**, 737-745, doi:10.1002/hep.22042 (2008).
- 54 Kaplan, M. M. & Gershwin, M. E. Primary biliary cirrhosis. *The New England journal of medicine* **353**, 1261-1273, doi:10.1056/NEJMra043898 (2005).
- 55 Van de Water, J., Gershwin, M. E., Leung, P., Ansari, A. & Coppel, R. L. The autoepitope of the 74-kD mitochondrial autoantigen of primary biliary cirrhosis corresponds to the functional site of dihydrolipoamide acetyltransferase. *The Journal of experimental medicine* **167**, 1791-1799 (1988).
- 56 Shimoda, S. *et al.* Molecular mimicry of mitochondrial and nuclear autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* **124**, 1915-1925 (2003).
- 57 Hirschfield, G. M. & Invernizzi, P. Progress in the genetics of primary biliary cirrhosis. *Seminars in liver disease* **31**, 147-156, doi:10.1055/s-0031-1276644 (2011).

- 58 Bogdanos, D. P., Invernizzi, P., Mackay, I. R. & Vergani, D. Autoimmune liver serology: current diagnostic and clinical challenges. *World journal of gastroenterology* : WJG 14, 3374-3387 (2008).
- 59 Liu, X. *et al.* Genome-wide meta-analyses identify three loci associated with primary biliary cirrhosis. *Nature genetics* **42**, 658-660, doi:10.1038/ng.627 (2010).
- 60 Metcalf, J. V. *et al.* Natural history of early primary biliary cirrhosis. *Lancet* **348**, 1399-1402, doi:10.1016/S0140-6736(96)04410-8 (1996).
- 61 Gershwin, M. E. *et al.* Risk factors and comorbidities in primary biliary cirrhosis: a controlled interview-based study of 1032 patients. *Hepatology* **42**, 1194-1202, doi:10.1002/hep.20907 (2005).
- 62 Lohse, A. W. & Mieli-Vergani, G. Autoimmune hepatitis. *Journal of hepatology* 55, 171-182, doi:10.1016/j.jhep.2010.12.012 (2011).
- 63 Boberg, K. M. *et al.* Incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, and autoimmune hepatitis in a Norwegian population. *Scandinavian journal of gastroenterology* **33**, 99-103 (1998).
- Heneghan, M. A., Yeoman, A. D., Verma, S., Smith, A. D. & Longhi, M. S. Autoimmune hepatitis. *Lancet* 382, 1433-1444, doi:10.1016/S0140-6736(12)62163-1 (2013).
- Donaldson, P. T. Genetics of liver disease: immunogenetics and disease pathogenesis.*Gut* 53, 599-608 (2004).
- Teufel, A. *et al.* Concurrent autoimmune diseases in patients with autoimmune hepatitis.
 Journal of clinical gastroenterology 44, 208-213, doi:10.1097/MCG.0b013e3181c74e0d (2010).
- 67 Kerkar, N. *et al.* Cytochrome P4502D6(193-212): a new immunodominant epitope and target of virus/self cross-reactivity in liver kidney microsomal autoantibody type 1-positive liver disease. *Journal of immunology* **170**, 1481-1489 (2003).
- 68 Longhi, M. S. *et al.* Impairment of CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells in autoimmune liver disease. *Journal of hepatology* **41**, 31-37, doi:10.1016/j.jhep.2004.03.008 (2004).
- 69 Alvarez, F. *et al.* International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *Journal of hepatology* **31**, 929-938 (1999).
- 70 Crapper, R. M., Bhathal, P. S., Mackay, I. R. & Frazer, I. H. 'Acute' autoimmune hepatitis. *Digestion* **34**, 216-225 (1986).
- 71 Al-Chalabi, T., Boccato, S., Portmann, B. C., McFarlane, I. G. & Heneghan, M. A. Autoimmune hepatitis (AIH) in the elderly: a systematic retrospective analysis of a large

group of consecutive patients with definite AIH followed at a tertiary referral centre. *Journal of hepatology* **45**, 575-583, doi:10.1016/j.jhep.2006.04.007 (2006).

- 72 Mix, H. *et al.* Identification of CD4 T-cell epitopes in soluble liver antigen/liver pancreas autoantigen in autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* **135**, 2107-2118, doi:10.1053/j.gastro.2008.07.029 (2008).
- Vergani, D., Longhi, M. S., Bogdanos, D. P., Ma, Y. & Mieli-Vergani, G. Autoimmune hepatitis. *Seminars in immunopathology* 31, 421-435, doi:10.1007/s00281-009-0170-7 (2009).
- 74 Czaja, A. J. & Carpenter, H. A. Histological findings in chronic hepatitis C with autoimmune features. *Hepatology* **26**, 459-466, doi:10.1002/hep.510260229 (1997).
- 75 Kessler, W. R. *et al.* Fulminant hepatic failure as the initial presentation of acute autoimmune hepatitis. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* **2**, 625-631 (2004).
- Baeres, M. *et al.* Establishment of standardised SLA/LP immunoassays: specificity for autoimmune hepatitis, worldwide occurrence, and clinical characteristics. *Gut* 51, 259-264 (2002).
- Stellon, A. J., Keating, J. J., Johnson, P. J., McFarlane, I. G. & Williams, R.
 Maintenance of remission in autoimmune chronic active hepatitis with azathioprine after corticosteroid withdrawal. *Hepatology* 8, 781-784 (1988).
- 78 Mottershead, M. & Neuberger, J. Transplantation in autoimmune liver diseases. *World journal of gastroenterology : WJG* **14**, 3388-3395 (2008).
- 79 Miyake, Y. *et al.* Clinical characteristics of fulminant-type autoimmune hepatitis: an analysis of eleven cases. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **23**, 1347-1353, doi:10.1111/j.1365-2036.2006.02894.x (2006).
- Muranski, P. & Restifo, N. P. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood*121, 2402-2414, doi:10.1182/blood-2012-09-378653 (2013).
- Basu, R., Hatton, R. D. & Weaver, C. T. The Th17 family: flexibility follows function.
 Immunological reviews 252, 89-103, doi:10.1111/imr.12035 (2013).
- Oestreich, K. J. & Weinmann, A. S. Transcriptional mechanisms that regulate T helper
 1 cell differentiation. *Current opinion in immunology* 24, 191-195, doi:10.1016/j.coi.2011.12.004 (2012).
- Zheng, W. & Flavell, R. A. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89, 587-596 (1997).
- Lambrecht, B. N. *et al.* Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *The Journal of clinical investigation* 106, 551-559, doi:10.1172/JCI8107 (2000).
- 85 Ma, C. S., Deenick, E. K., Batten, M. & Tangye, S. G. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *The Journal of experimental medicine* 209, 1241-1253, doi:10.1084/jem.20120994 (2012).
- Kagami, S., Rizzo, H. L., Lee, J. J., Koguchi, Y. & Blauvelt, A. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *The Journal of investigative dermatology* 130, 1373-1383, doi:10.1038/jid.2009.399 (2010).
- 87 Wilhelm, C., Turner, J. E., Van Snick, J. & Stockinger, B. The many lives of IL-9: a question of survival? *Nature immunology* **13**, 637-641, doi:10.1038/ni.2303 (2012).
- 88 Ramming, A., Druzd, D., Leipe, J., Schulze-Koops, H. & Skapenko, A. Maturationrelated histone modifications in the PU.1 promoter regulate Th9-cell development. *Blood* 119, 4665-4674, doi:10.1182/blood-2011-11-392589 (2012).
- 89 Geginat, J. *et al.* The CD4-centered universe of human T cell subsets. *Seminars in immunology* **25**, 252-262, doi:10.1016/j.smim.2013.10.012 (2013).
- Sartor, R. B. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 134, 577-594, doi:10.1053/j.gastro.2007.11.059 (2008).
- 91 de Jong, E., Suddason, T. & Lord, G. M. Translational mini-review series on Th17 cells: development of mouse and human T helper 17 cells. *Clinical and experimental immunology* 159, 148-158, doi:10.1111/j.1365-2249.2009.04041.x (2010).
- 92 Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology* **27**, 485-517, doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132710 (2009).
- Khader, S. A., Gaffen, S. L. & Kolls, J. K. Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosal immunology* 2, 403-411, doi:10.1038/mi.2009.100 (2009).
- 94 Crome, S. Q., Wang, A. Y. & Levings, M. K. Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. *Clinical and experimental immunology* **159**, 109-119, doi:10.1111/j.1365-2249.2009.04037.x (2010).
- 95 Gaffen, S. L. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nature reviews*. *Immunology* **9**, 556-567, doi:10.1038/nri2586 (2009).

- 96 Ouyang, W., Kolls, J. K. & Zheng, Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 28, 454-467, doi:10.1016/j.immuni.2008.03.004 (2008).
- Kolls, J. K. & Linden, A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21, 467-476, doi:10.1016/j.immuni.2004.08.018 (2004).
- 98 Rangel-Moreno, J. *et al.* The development of inducible bronchus-associated lymphoid tissue depends on IL-17. *Nature immunology* **12**, 639-646, doi:10.1038/ni.2053 (2011).
- Bettelli, E., Korn, T., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 453, 1051-1057, doi:10.1038/nature07036 (2008).
- 100 Malley, R. *et al.* Antibody-independent, interleukin-17A-mediated, cross-serotype immunity to pneumococci in mice immunized intranasally with the cell wall polysaccharide. *Infection and immunity* **74**, 2187-2195, doi:10.1128/IAI.74.4.2187-2195.2006 (2006).
- 101 Liang, S. C. *et al.* Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *The Journal of experimental medicine* **203**, 2271-2279, doi:10.1084/jem.20061308 (2006).
- 102 Aujla, S. J. *et al.* IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nature medicine* **14**, 275-281, doi:10.1038/nm1710 (2008).
- 103 Gerosa, F. *et al.* Differential regulation of interleukin 12 and interleukin 23 production in human dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* **205**, 1447-1461, doi:10.1084/jem.20071450 (2008).
- 104 Zhou, L. *et al.* IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature immunology* **8**, 967-974, doi:10.1038/ni1488 (2007).
- Park, H. *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature immunology* 6, 1133-1141, doi:10.1038/ni1261 (2005).
- 106 Oida, T. & Weiner, H. L. Depletion of TGF-beta from fetal bovine serum. *Journal of immunological methods* 362, 195-198, doi:10.1016/j.jim.2010.09.008 (2010).
- Qin, H. *et al.* TGF-beta promotes Th17 cell development through inhibition of SOCS3.
 Journal of immunology 183, 97-105, doi:10.4049/jimmunol.0801986 (2009).
- 108 Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M. & Stockinger, B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of

IL-17-producing T cells. *Immunity* **24**, 179-189, doi:10.1016/j.immuni.2006.01.001 (2006).

- 109 Zhou, L. *et al.* TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. *Nature* 453, 236-240, doi:10.1038/nature06878 (2008).
- 110 Laurence, A. *et al.* Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* **26**, 371-381, doi:10.1016/j.immuni.2007.02.009 (2007).
- 111 Beriou, G. *et al.* IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood* **113**, 4240-4249, doi:10.1182/blood-2008-10-183251 (2009).
- 112 Annunziato, F. *et al.* Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *The Journal of experimental medicine* **204**, 1849-1861, doi:10.1084/jem.20070663 (2007).
- 113 Ramesh, R. *et al.* Pro-inflammatory human Th17 cells selectively express Pglycoprotein and are refractory to glucocorticoids. *The Journal of experimental medicine* 211, 89-104, doi:10.1084/jem.20130301 (2014).
- Jager, A. & Kuchroo, V. K. Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. *Scandinavian journal of immunology* 72, 173-184, doi:10.1111/j.1365-3083.2010.02432.x (2010).
- 115 Spolski, R. *et al.* IL-21 promotes the pathologic immune response to pneumovirus infection. *Journal of immunology* **188**, 1924-1932, doi:10.4049/jimmunol.1100767 (2012).
- 116 Acosta-Rodriguez, E. V. *et al.* Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nature immunology* 8, 639-646, doi:10.1038/ni1467 (2007).
- El-Behi, M. *et al.* The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nature immunology* 12, 568-575, doi:10.1038/ni.2031 (2011).
- Hsu, W. *et al.* Differential mechanisms in the pathogenesis of autoimmune cholangitis versus inflammatory bowel disease in interleukin-2Ralpha(-/-) mice. *Hepatology* 49, 133-140, doi:10.1002/hep.22591 (2009).
- 119 Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. Immunologic selftolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of immunology* 155, 1151-1164 (1995).

- 120 Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T. & Ono, M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* **133**, 775-787, doi:10.1016/j.cell.2008.05.009 (2008).
- 121 Shevach, E. M. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* **25**, 195-201, doi:10.1016/j.immuni.2006.08.003 (2006).
- 122 Thornton, A. M. & Shevach, E. M. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *Journal of immunology* 164, 183-190 (2000).
- 123 Mills, K. H. & McGuirk, P. Antigen-specific regulatory T cells--their induction and role in infection. *Seminars in immunology* 16, 107-117, doi:10.1016/j.smim.2003.12.006 (2004).
- 124 Wu, K., Bi, Y., Sun, K. & Wang, C. IL-10-producing type 1 regulatory T cells and allergy. *Cellular & molecular immunology* **4**, 269-275 (2007).
- 125 Sakaguchi, S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual review of immunology* 22, 531-562, doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141122 (2004).
- Hammerich, L., Heymann, F. & Tacke, F. Role of IL-17 and Th17 cells in liver diseases.
 Clinical & developmental immunology 2011, 345803, doi:10.1155/2011/345803
 (2011).
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. & O'Garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology* 19, 683-765, doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.683 (2001).
- Hawrylowicz, C. M. & O'Garra, A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nature reviews. Immunology* 5, 271-283, doi:10.1038/nri1589 (2005).
- 129 Magnani, C. F. *et al.* Killing of myeloid APCs via HLA class I, CD2 and CD226 defines a novel mechanism of suppression by human Tr1 cells. *European journal of immunology* **41**, 1652-1662, doi:10.1002/eji.201041120 (2011).
- 130 Groux, H. *et al.* A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**, 737-742, doi:10.1038/39614 (1997).
- 131 Beissert, S., Schwarz, A. & Schwarz, T. Regulatory T cells. *The Journal of investigative dermatology* **126**, 15-24, doi:10.1038/sj.jid.5700004 (2006).
- 132 Loser, K. & Beissert, S. Regulatory T cells: banned cells for decades. *The Journal of investigative dermatology* 132, 864-871, doi:10.1038/jid.2011.375 (2012).

- 133 Allan, S. E. *et al.* Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *International immunology* **19**, 345-354, doi:10.1093/intimm/dxm014 (2007).
- 134 Liu, W. *et al.* CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *The Journal of experimental medicine* 203, 1701-1711, doi:10.1084/jem.20060772 (2006).
- Huehn, J., Polansky, J. K. & Hamann, A. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nature reviews. Immunology* 9, 83-89, doi:10.1038/nri2474 (2009).
- Hill, J. A. *et al.* Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity* 27, 786-800, doi:10.1016/j.immuni.2007.09.010 (2007).
- 137 Thornton, A. M. *et al.* Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *Journal of immunology* **184**, 3433-3441, doi:10.4049/jimmunol.0904028 (2010).
- 138 Takahashi, T. *et al.* 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**, 1969-1980 (1998).
- 139 Grohmann, U. *et al.* CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nature immunology* **3**, 1097-1101, doi:10.1038/ni846 (2002).
- Sakuishi, K. *et al.* TIM3FOXP3 regulatory T cells are tissue-specific promoters of T-cell dysfunction in cancer. *Oncoimmunology* 2, e23849, doi:10.4161/onci.23849 (2013).
- 141 Zhu, C. *et al.* The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nature immunology* **6**, 1245-1252, doi:10.1038/ni1271 (2005).
- 142 Read, S., Malmstrom, V. & Powrie, F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *The Journal of experimental medicine* **192**, 295-302 (2000).
- 143 Collison, L. W. *et al.* The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* **450**, 566-569, doi:10.1038/nature06306 (2007).
- 144 Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J. & Lenardo, M. J. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nature immunology* 8, 1353-1362, doi:10.1038/ni1536 (2007).

- 145 Stockis, J., Colau, D., Coulie, P. G. & Lucas, S. Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF-beta on the surface of activated human Treg. *European journal of immunology* **39**, 3315-3322, doi:10.1002/eji.200939684 (2009).
- 146 Tran, D. Q. et al. GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGFbeta on platelets and activated FOXP3+ regulatory T cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106, 13445-13450, doi:10.1073/pnas.0901944106 (2009).
- 147 Gauthy, E. *et al.* GARP is regulated by miRNAs and controls latent TGF-beta1 production by human regulatory T cells. *PloS one* **8**, e76186, doi:10.1371/journal.pone.0076186 (2013).
- Wipff, P. J. & Hinz, B. Integrins and the activation of latent transforming growth factor beta1 an intimate relationship. *European journal of cell biology* 87, 601-615, doi:10.1016/j.ejcb.2008.01.012 (2008).
- Stockis, J. *et al.* Comparison of stable human Treg and Th clones by transcriptional profiling. *European journal of immunology* **39**, 869-882, doi:10.1002/eji.200838807 (2009).
- 150 Le Bourhis, L., Mburu, Y. K. & Lantz, O. MAIT cells, surveyors of a new class of antigen: development and functions. *Current opinion in immunology* 25, 174-180, doi:10.1016/j.coi.2013.01.005 (2013).
- 151 Treiner, E. & Lantz, O. CD1d- and MR1-restricted invariant T cells: of mice and men. *Current opinion in immunology* **18**, 519-526, doi:10.1016/j.coi.2006.07.001 (2006).
- 152 Tilloy, F. *et al.* An invariant T cell receptor alpha chain defines a novel TAPindependent major histocompatibility complex class Ib-restricted alpha/beta T cell subpopulation in mammals. *The Journal of experimental medicine* **189**, 1907-1921 (1999).
- 153 Le Bourhis, L. *et al.* Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nature immunology* **11**, 701-708, doi:10.1038/ni.1890 (2010).
- 154 Kjer-Nielsen, L. *et al.* MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells.*Nature* 491, 717-723, doi:10.1038/nature11605 (2012).
- Gold, M. C. & Lewinsohn, D. M. Co-dependents: MR1-restricted MAIT cells and their antimicrobial function. *Nature reviews. Microbiology* 11, 14-19, doi:10.1038/nrmicro2918 (2013).

- Dusseaux, M. *et al.* Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted,
 CD161hi IL-17-secreting T cells. *Blood* 117, 1250-1259, doi:10.1182/blood-2010-08-303339 (2011).
- 157 Tang, X. Z. *et al.* IL-7 licenses activation of human liver intrasinusoidal mucosalassociated invariant T cells. *Journal of immunology* **190**, 3142-3152, doi:10.4049/jimmunol.1203218 (2013).
- 158 Billerbeck, E. et al. Analysis of CD161 expression on human CD8+ T cells defines a distinct functional subset with tissue-homing properties. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107, 3006-3011, doi:10.1073/pnas.0914839107 (2010).
- 159 Martin, E. *et al.* Stepwise development of MAIT cells in mouse and human. *PLoS biology* **7**, e54, doi:10.1371/journal.pbio.1000054 (2009).
- 160 Benlagha, K., Kyin, T., Beavis, A., Teyton, L. & Bendelac, A. A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science* 296, 553-555 (2002).
- Arumugam, M. *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473, 174-180, doi:10.1038/nature09944 (2011).
- 162 Serriari, N. E. *et al.* Innate Mucosal-Associated Invariant T (MAIT) cells are activated in Inflammatory Bowel Diseases. *Clinical and experimental immunology*, doi:10.1111/cei.12277 (2014).
- Merino, D. *et al.* The role of BH3-only protein Bim extends beyond inhibiting Bcl-2-like prosurvival proteins. *The Journal of cell biology* 186, 355-362, doi:10.1083/jcb.200905153 (2009).
- Bouillet, P. & O'Reilly, L. A. CD95, BIM and T cell homeostasis. *Nature reviews*. *Immunology* 9, 514-519, doi:10.1038/nri2570 (2009).
- 165 Strasser, A., Cory, S. & Adams, J. M. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *The EMBO journal* **30**, 3667-3683, doi:10.1038/emboj.2011.307 (2011).
- 166 Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26, 239-257 (1972).
- Levine, B. L. *et al.* Effects of CD28 costimulation on long-term proliferation of CD4+
 T cells in the absence of exogenous feeder cells. *Journal of immunology* 159, 5921-5930 (1997).

- 168 Strasser, A. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nature reviews*. *Immunology* **5**, 189-200, doi:10.1038/nri1568 (2005).
- 169 Lenardo, M. *et al.* Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annual review of immunology* **17**, 221-253, doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.221 (1999).
- Strasser, A., Harris, A. W., Huang, D. C., Krammer, P. H. & Cory, S. Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *The EMBO journal* 14, 6136-6147 (1995).
- 171 Snow, A. L., Pandiyan, P., Zheng, L., Krummey, S. M. & Lenardo, M. J. The power and the promise of restimulation-induced cell death in human immune diseases. *Immunological reviews* 236, 68-82, doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00917.x (2010).
- Bidere, N., Su, H. C. & Lenardo, M. J. Genetic disorders of programmed cell death in the immune system. *Annual review of immunology* 24, 321-352, doi:10.1146/annurev.immunol.24.021605.090513 (2006).
- 173 Snow, A. L. *et al.* Restimulation-induced apoptosis of T cells is impaired in patients with X-linked lymphoproliferative disease caused by SAP deficiency. *The Journal of clinical investigation* **119**, 2976-2989, doi:10.1172/JCI39518 (2009).
- 174 Siegel, R. M. *et al.* Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* **288**, 2354-2357 (2000).
- 175 Strasser, A., Jost, P. J. & Nagata, S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* **30**, 180-192, doi:10.1016/j.immuni.2009.01.001 (2009).
- 176 Kischkel, F. C. *et al.* Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO journal* 14, 5579-5588 (1995).
- 177 Trambas, C. M. & Griffiths, G. M. Delivering the kiss of death. *Nature immunology* **4**, 399-403, doi:10.1038/ni0503-399 (2003).
- 178 Sneller, M. C. *et al.* A novel lymphoproliferative/autoimmune syndrome resembling murine lpr/gld disease. *The Journal of clinical investigation* **90**, 334-341, doi:10.1172/JCI115867 (1992).
- 179 Fisher, G. H. *et al.* Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* **81**, 935-946 (1995).
- 180 Ju, S. T. *et al.* Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after Tcell activation. *Nature* 373, 444-448, doi:10.1038/373444a0 (1995).

- 181 Schmitz, I. *et al.* An IL-2-dependent switch between CD95 signaling pathways sensitizes primary human T cells toward CD95-mediated activation-induced cell death. *Journal of immunology* 171, 2930-2936 (2003).
- 182 Sandalova, E., Wei, C. H., Masucci, M. G. & Levitsky, V. Regulation of expression of Bcl-2 protein family member Bim by T cell receptor triggering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 3011-3016, doi:10.1073/pnas.0400005101 (2004).
- 183 Duke, R. C. & Cohen, J. J. IL-2 addiction: withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T cells. *Lymphokine research* **5**, 289-299 (1986).
- 184 Cory, S. & Adams, J. M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch.
 Nature reviews. Cancer 2, 647-656, doi:10.1038/nrc883 (2002).
- 185 Giam, M., Huang, D. C. & Bouillet, P. BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. *Oncogene* 27 Suppl 1, S128-136, doi:10.1038/onc.2009.50 (2008).
- 186 van Delft, M. F. & Huang, D. C. How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. *Cell research* 16, 203-213, doi:10.1038/sj.cr.7310028 (2006).
- 187 Wolter, K. G. *et al.* Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *The Journal of cell biology* **139**, 1281-1292 (1997).
- 188 Gavathiotis, E. *et al.* BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature* 455, 1076-1081, doi:10.1038/nature07396 (2008).
- 189 Bouillet, P. *et al.* Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 286, 1735-1738 (1999).
- 190 Kim, H. *et al.* Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Molecular cell* **36**, 487-499, doi:10.1016/j.molcel.2009.09.030 (2009).
- 191 Dijkers, P. F., Medema, R. H., Lammers, J. W., Koenderman, L. & Coffer, P. J. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Current biology : CB* 10, 1201-1204 (2000).
- 192 Ley, R., Balmanno, K., Hadfield, K., Weston, C. & Cook, S. J. Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim. *The Journal of biological chemistry* 278, 18811-18816, doi:10.1074/jbc.M301010200 (2003).

- 193 Reizis, B., Bunin, A., Ghosh, H. S., Lewis, K. L. & Sisirak, V. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annual review of immunology* 29, 163-183, doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101345 (2011).
- Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252, doi:10.1038/32588 (1998).
- 195 Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine* **137**, 1142-1162 (1973).
- Banchereau, J. *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology* **18**, 767-811, doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.767 (2000).
- 197 Sozzani, S., Vermi, W., Del Prete, A. & Facchetti, F. Trafficking properties of plasmacytoid dendritic cells in health and disease. *Trends in immunology* **31**, 270-277, doi:10.1016/j.it.2010.05.004 (2010).
- 198 Siegal, F. P. *et al.* The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* **284**, 1835-1837 (1999).
- 199 Grouard, G. *et al.* The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *The Journal of experimental medicine* **185**, 1101-1111 (1997).
- 200 Dzionek, A. *et al.* BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *The Journal of experimental medicine* **194**, 1823-1834 (2001).
- 201 Cisse, B. *et al.* Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell* 135, 37-48, doi:10.1016/j.cell.2008.09.016 (2008).
- Zielinski, C. E. *et al.* Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1beta. *Nature* 484, 514-518, doi:10.1038/nature10957 (2012).
- Huber, S. *et al.* Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3() and Foxp3+ regulatory CD4+ T cells in an interleukin-10-dependent manner. *Immunity* 34, 554-565, doi:10.1016/j.immuni.2011.01.020 (2011).
- 204 Ahern, P. P. *et al.* Interleukin-23 drives intestinal inflammation through direct activity on T cells. *Immunity* **33**, 279-288, doi:10.1016/j.immuni.2010.08.010 (2010).

- 205 Monteleone, I., Sarra, M., Pallone, F. & Monteleone, G. Th17-related cytokines in inflammatory bowel diseases: friends or foes? *Current molecular medicine* **12**, 592-597 (2012).
- 206 Rael, E. L. & Lockey, R. F. Interleukin-13 signaling and its role in asthma. *The World Allergy Organization journal* **4**, 54-64, doi:10.1097/WOX.0b013e31821188e0 (2011).
- 207 Liu, Y., Munker, S., Mullenbach, R. & Weng, H. L. IL-13 Signaling in Liver Fibrogenesis. *Frontiers in immunology* **3**, 116, doi:10.3389/fimmu.2012.00116 (2012).
- 208 Asadullah, K., Sterry, W. & Volk, H. D. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacological reviews* **55**, 241-269, doi:10.1124/pr.55.2.4 (2003).
- Alanara, T., Karstila, K., Moilanen, T., Silvennoinen, O. & Isomaki, P. Expression of IL-10 family cytokines in rheumatoid arthritis: elevated levels of IL-19 in the joints. *Scandinavian journal of rheumatology* **39**, 118-126, doi:10.3109/03009740903170823 (2010).
- 210 Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K. & Muller, W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **75**, 263-274 (1993).
- 211 Terjung, B. *et al.* p-ANCAs in autoimmune liver disorders recognise human betatubulin isotype 5 and cross-react with microbial protein FtsZ. *Gut* **59**, 808-816, doi:10.1136/gut.2008.157818 (2010).
- Rudolph, G. *et al.* Influence of dominant bile duct stenoses and biliary infections on outcome in primary sclerosing cholangitis. *Journal of hepatology* 51, 149-155, doi:10.1016/j.jhep.2009.01.023 (2009).
- 213 Kulaksiz, H. *et al.* Biliary candida infections in primary sclerosing cholangitis. *Journal of hepatology* **45**, 711-716, doi:10.1016/j.jhep.2006.07.022 (2006).
- 214 Ye, P. *et al.* Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *The Journal of experimental medicine* **194**, 519-527 (2001).
- 215 Miossec, P., Korn, T. & Kuchroo, V. K. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *The New England journal of medicine* **361**, 888-898, doi:10.1056/NEJMra0707449 (2009).
- 216 Jyonouchi, H., Geng, L., Cushing-Ruby, A. & Monteiro, I. M. Aberrant responses to TLR agonists in pediatric IBD patients; the possible association with increased production of Th1/Th17 cytokines in response to candida, a luminal antigen. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 21, e747-755, doi:10.1111/j.1399-3038.2009.00923.x (2010).

- Kleinschek, M. A. *et al.* Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. *The Journal of experimental medicine* 206, 525-534, doi:10.1084/jem.20081712 (2009).
- 218 Hueber, W. *et al.* Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut* 61, 1693-1700, doi:10.1136/gutjnl-2011-301668 (2012).
- 219 Hirota, K. *et al.* Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nature immunology* **12**, 255-263, doi:10.1038/ni.1993 (2011).
- 220 Lee, Y. *et al.* Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nature immunology* **13**, 991-999, doi:10.1038/ni.2416 (2012).
- 221 Sheth, P., Delos Santos, N., Seth, A., LaRusso, N. F. & Rao, R. K. Lipopolysaccharide disrupts tight junctions in cholangiocyte monolayers by a c-Src-, TLR4-, and LBPdependent mechanism. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 293, G308-318, doi:10.1152/ajpgi.00582.2006 (2007).
- Syal, G., Fausther, M. & Dranoff, J. A. Advances in cholangiocyte immunobiology.
 American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology 303, G1077-1086, doi:10.1152/ajpgi.00227.2012 (2012).
- Oo, Y. H. *et al.* CXCR3-dependent recruitment and CCR6-mediated positioning of Th 17 cells in the inflamed liver. *Journal of hepatology* 57, 1044-1051, doi:10.1016/j.jhep.2012.07.008 (2012).
- 224 Curbishley, S. M., Eksteen, B., Gladue, R. P., Lalor, P. & Adams, D. H. CXCR 3 activation promotes lymphocyte transendothelial migration across human hepatic endothelium under fluid flow. *The American journal of pathology* **167**, 887-899, doi:10.1016/S0002-9440(10)62060-3 (2005).
- 225 Olsson, R. *et al.* Bile duct bacterial isolates in primary sclerosing cholangitis: a study of explanted livers. *Journal of hepatology* 28, 426-432 (1998).
- Harada, K. *et al.* Periductal interleukin-17 production in association with biliary innate immunity contributes to the pathogenesis of cholangiopathy in primary biliary cirrhosis. *Clinical and experimental immunology* 157, 261-270, doi:10.1111/j.1365-2249.2009.03947.x (2009).
- Meng, F. *et al.* Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* 143, 765-776 e761-763, doi:10.1053/j.gastro.2012.05.049 (2012).

- 228 Fichtner-Feigl, S., Strober, W., Kawakami, K., Puri, R. K. & Kitani, A. IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. *Nature medicine* **12**, 99-106, doi:10.1038/nm1332 (2006).
- Wynn, T. A. IL-13 effector functions. *Annual review of immunology* 21, 425-456, doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141142 (2003).
- Fuss, I. J. *et al.* Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *The Journal of clinical investigation* 113, 1490-1497, doi:10.1172/JCI19836 (2004).
- Biancheri, P. *et al.* Absence of a role for interleukin-13 in inflammatory bowel disease.
 European journal of immunology 44, 370-385, doi:10.1002/eji.201343524 (2014).
- Kool, M. *et al.* An anti-inflammatory role for plasmacytoid dendritic cells in allergic airway inflammation. *Journal of immunology* 183, 1074-1082, doi:10.4049/jimmunol.0900471 (2009).
- 233 Farkas, L., Beiske, K., Lund-Johansen, F., Brandtzaeg, P. & Jahnsen, F. L. Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *The American journal of pathology* **159**, 237-243 (2001).
- 234 Serriari, N. E. *et al.* Innate mucosal-associated invariant T (MAIT) cells are activated in inflammatory bowel diseases. *Clinical and experimental immunology* **176**, 266-274, doi:10.1111/cei.12277 (2014).
- Matteucci, E., Ghimenti, M., Di Beo, S. & Giampietro, O. Altered proportions of naive, central memory and terminally differentiated central memory subsets among CD4+ and CD8 + T cells expressing CD26 in patients with type 1 diabetes. *Journal of clinical immunology* 31, 977-984, doi:10.1007/s10875-011-9573-z (2011).
- Eidson, M. *et al.* Altered development of NKT cells, gammadelta T cells, CD8 T cells and NK cells in a PLZF deficient patient. *PloS one* 6, e24441, doi:10.1371/journal.pone.0024441 (2011).
- 237 Illes, Z., Shimamura, M., Newcombe, J., Oka, N. & Yamamura, T. Accumulation of Valpha7.2-Jalpha33 invariant T cells in human autoimmune inflammatory lesions in the nervous system. *International immunology* 16, 223-230 (2004).
- 238 Abrahamsson, S. V. *et al.* Non-myeloablative autologous haematopoietic stem cell transplantation expands regulatory cells and depletes IL-17 producing mucosalassociated invariant T cells in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* **136**, 2888-2903, doi:10.1093/brain/awt182 (2013).

- 239 Gold, M. C. *et al.* Human mucosal associated invariant T cells detect bacterially infected cells. *PLoS biology* **8**, e1000407, doi:10.1371/journal.pbio.1000407 (2010).
- Cretney, E., Kallies, A. & Nutt, S. L. Differentiation and function of Foxp3(+) effector regulatory T cells. *Trends in immunology* 34, 74-80, doi:10.1016/j.it.2012.11.002 (2013).
- 241 Nadkarni, S., Mauri, C. & Ehrenstein, M. R. Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta. *The Journal of experimental medicine* **204**, 33-39, doi:10.1084/jem.20061531 (2007).
- 242 Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H. L. & Hafler, D. A. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine* **199**, 971-979, doi:10.1084/jem.20031579 (2004).
- 243 Peiseler, M. *et al.* FOXP3+ regulatory T cells in autoimmune hepatitis are fully functional and not reduced in frequency. *Journal of hepatology* **57**, 125-132, doi:10.1016/j.jhep.2012.02.029 (2012).
- 244 Malek, T. R. & Castro, I. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity* **33**, 153-165, doi:10.1016/j.immuni.2010.08.004 (2010).
- 245 Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L. & Powrie, F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *The Journal of experimental medicine* **190**, 995-1004 (1999).
- Zhou, A. X., Kozhaya, L., Fujii, H. & Unutmaz, D. GARP-TGF-beta complexes negatively regulate regulatory T cell development and maintenance of peripheral CD4+
 T cells in vivo. *Journal of immunology* 190, 5057-5064, doi:10.4049/jimmunol.1300065 (2013).
- Rochman, Y., Spolski, R. & Leonard, W. J. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nature reviews. Immunology* 9, 480-490, doi:10.1038/nri2580 (2009).
- 248 Wang, R. *et al.* Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3+ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 13439-13444, doi:10.1073/pnas.0901965106 (2009).
- Koenen, H. J. *et al.* Human CD25highFoxp3pos regulatory T cells differentiate into IL 17-producing cells. *Blood* 112, 2340-2352, doi:10.1182/blood-2008-01-133967 (2008).
- 250 Gagliani, N. *et al.* Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nature medicine* **19**, 739-746, doi:10.1038/nm.3179 (2013).

- Snow, A. L. *et al.* Critical role for BIM in T cell receptor restimulation-induced death.
 Biology direct 3, 34, doi:10.1186/1745-6150-3-34 (2008).
- 252 Afford, S. C. *et al.* VCAM-1 expression by biliary epithelium promotes persistence of inflammation by inhibiting effector T cell apoptosis. *Hepatology*, doi:10.1002/hep.26965 (2013).
- 253 Marui, N. *et al.* Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *The Journal of clinical investigation* **92**, 1866-1874, doi:10.1172/JCI116778 (1993).
- 254 Kopycinska, J. et al. Activation of FoxO3a/Bim axis in patients with Primary Biliary Cirrhosis. Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver 33, 231-238, doi:10.1111/liv.12030 (2013).
- Liaskou, E. *et al.* Loss of CD28 Expression by Liver-infiltrating T cells Contributes to
 Pathogenesis of Primary Sclerosing Cholangitis. *Gastroenterology*,
 doi:10.1053/j.gastro.2014.04.003 (2014).

Abb.	Abbildung
ABTS	Diammonium-2.2'-azino-di-(3-
	ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure
AIH	Autoimmune Hepatitis
AK	Antikörper
ALT	Alaninaminotransferase
AMA	antimitochondriale Antikörper
ANA	antinukleäre Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen-präsentierende Zelle
AST	Aspartataminotransferase
BEC	biliäre Epithelzelle
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
С	Celsius
с	Konzentration
C. albicans	Candida albicans
CARD	caspase-associated recruitment domain
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
CD	Unterscheidungsgruppen (Cluster of
	differentiation)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CTLA-4	Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4
ct	cycle threshold
CWID	Zytokinentzug-induzierter Zelltod
DC	Dentritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle autoimmune
	Encephalomyelitis
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E. feacalis	Enterococcus feacalis
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERCP	Endoskopie
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
Fc	Komplementprotein
FCS	Fetale Kälberserum
FIIC	Fluoresceinisothiocyanat
Foxp3	forkhead/winged helix Transkriptionsfaktor
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
g	Gramm
GARP	Glycoprotein A repititions predominant
GIIK	Glucocorticoid-induced TNFR-related
1	protein
h	Stunde

HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLA	Human Leukocyte Antigen
HRP	Meerrettich Peroxidase (Horse Raddish
	Peroxidase)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iMFI	integrierte mittlere Fluoreszenzintensität
IRAK-M	interleukin-1 receptor-associated kinase
	mono-myelocytic
iTreg	induzierte regulatorische T-Zelle
kg	Kilogramm
1	Liter
LAP	latency-associated peptide
LKM	Mikrosomen in Leber und Milz
LPS	Lipopolysaccharid
LSEC	Sinuosoidale Endothelzelle der Leber
М	Molar
m	männlich
MACS	Magnet Activated Cell Sorting
MadCAM-1	mucosal vascular addressin cell adhesion
	molecule 1
MAIT	Mukosa-assoziierten invarianten T-Zelle
mg	Milligramm
μg	Mikrogramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major
	Histocompatibility Complex)
min	Minute
ml	Milliliter
μΙ	Mikroliter
mM	Millimol
MRCP	Magnetresonanztomographie
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (Messenger
	Ribonucleic Acid)
MS	Multiple Sklerose
N	Normalität
NF-κB	nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer"
	of activated B-cells
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen (Natural Killer
	Cells)
NKT-Zellen	Natürliche Killer T-Zellen (Natural Killer T
	Cells)
ns	nicht signifikant
nTreg	natürliche regulatorische T-Zelle
OD	optische Dichte
PacO-NHS	Pacific Orange Succimidyl Ester
PAMPS	Pathogen-assoziierte Muster

PBC	Primär Biliäre Zirrhose
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBMC	periphere mononukleäre Zelle
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PD-1	Programmed Death Receptor 1
pDC	plasmazytoide DC
PDC-E2	Pyruvat-Dehydrogenasekomplexes
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
pg	Picogramm
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
P/S	Penecillin/Streptavidin
PSC	Primär Sklerosierende Cholangitis
qRT-PCR	quantitative Real Time-PCR
rpm	Umdrehung pro Minute
ŔA	Rheumatoide Arthritis
RICD	Restimulierungs-induzierter Zelltod
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)
RORyt	retinoic acid-related orphan receptor
	gamma-t
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
S.	siehe
S. aureus	Staphylokokkus aureus
sec	Sekunden
GLGIDD	• 1 • 1 1 1• • . 1 1• 1
SIGIRR	single-immunoglobulin interleukin-l
SIGIRR	receptor-related
SLE	single-immunoglobulin interleukin-1 receptor-related Systemischer Lupus Erythematodes
SIGIRR SLE SMA	Single-immunoglobulin interleukin-1 receptor-related Systemischer Lupus Erythematodes Autoantikörper gegen die glatte Muskulatur
SIGIRR SLE SMA	Single-immunoglobulin interleukin-1 receptor-related Systemischer Lupus Erythematodes Autoantikörper gegen die glatte Muskulatur (smooth muscle antibody)
SIGIRR SLE SMA SNP	Single-immunoglobulin interleukin-1 receptor-related Systemischer Lupus Erythematodes Autoantikörper gegen die glatte Muskulatur (smooth muscle antibody) Single Nucleotide Polymorphism
SIGIRR SLE SMA SNP SSC	Single-immunoglobulin interleukin-1 receptor-related Systemischer Lupus Erythematodes Autoantikörper gegen die glatte Muskulatur (smooth muscle antibody) Single Nucleotide Polymorphism Seitwärtsstreulicht (side scatter)
SIGIRR SLE SMA SNP SSC t	single-immunoglobulin interleukin-1 receptor-related Systemischer Lupus Erythematodes Autoantikörper gegen die glatte Muskulatur (smooth muscle antibody) Single Nucleotide Polymorphism Seitwärtsstreulicht (side scatter) Zeit
SIGIRR SLE SMA SNP SSC t Tab.	single-immunoglobulin interleukin-1 receptor-related Systemischer Lupus Erythematodes Autoantikörper gegen die glatte Muskulatur (smooth muscle antibody) Single Nucleotide Polymorphism Seitwärtsstreulicht (side scatter) Zeit Tabelle
SIGIRR SLE SMA SNP SSC t Tab. TBE	single-immunoglobulin interleukin-1 receptor-related Systemischer Lupus Erythematodes Autoantikörper gegen die glatte Muskulatur (smooth muscle antibody) Single Nucleotide Polymorphism Seitwärtsstreulicht (side scatter) Zeit Tabelle TRIS-Borat-EDTA-Puffer
SIGIRR SLE SMA SNP SSC t t Tab. TBE TBE TBS	single-immunoglobulin interleukin-1receptor-relatedSystemischer Lupus ErythematodesAutoantikörper gegen die glatte Muskulatur(smooth muscle antibody)Single Nucleotide PolymorphismSeitwärtsstreulicht (side scatter)ZeitTabelleTRIS-Borat-EDTA-PufferTris gepufferte Saline (Tris Buffered
SIGIRR SLE SMA SNP SSC t Tab. TBE TBS	single-immunoglobulin interleukin-1 receptor-related Systemischer Lupus Erythematodes Autoantikörper gegen die glatte Muskulatur (smooth muscle antibody) Single Nucleotide Polymorphism Seitwärtsstreulicht (side scatter) Zeit Tabelle TRIS-Borat-EDTA-Puffer Tris gepufferte Saline (Tris Buffered Saline)
SIGIRR SLE SMA SNP SSC t Tab. TBE TBE TBS TCR	single-immunoglobulin interleukin-1 receptor-related Systemischer Lupus Erythematodes Autoantikörper gegen die glatte Muskulatur (smooth muscle antibody) Single Nucleotide Polymorphism Seitwärtsstreulicht (side scatter) Zeit Tabelle TRIS-Borat-EDTA-Puffer Tris gepufferte Saline (Tris Buffered Saline) T-Zellrezeptor
SIGIRR SLE SMA SNP SSC t t Tab. TBE TBE TBS TCR TGF	single-immunoglobulin interleukin-1receptor-relatedSystemischer Lupus ErythematodesAutoantikörper gegen die glatte Muskulatur(smooth muscle antibody)Single Nucleotide PolymorphismSeitwärtsstreulicht (side scatter)ZeitTabelleTRIS-Borat-EDTA-PufferTris gepufferte Saline (Tris Buffered Saline)T-ZellrezeptorTransforming Growth Factor
SIGIRR SLE SMA SNP SSC t Tab. TBE TBS TCR TGF Th	single-immunoglobulin interleukin-1 receptor-related Systemischer Lupus Erythematodes Autoantikörper gegen die glatte Muskulatur (smooth muscle antibody) Single Nucleotide Polymorphism Seitwärtsstreulicht (side scatter) Zeit Tabelle TRIS-Borat-EDTA-Puffer Tris gepufferte Saline (Tris Buffered Saline) T-Zellrezeptor Transforming Growth Factor T Helfer
SIGIRR SLE SMA SNP SSC t Tab. TBE TBE TBE TBS TCR TGF Th Th Tim-3	single-immunoglobulin interleukin-1receptor-relatedSystemischer Lupus ErythematodesAutoantikörper gegen die glatte Muskulatur(smooth muscle antibody)Single Nucleotide PolymorphismSeitwärtsstreulicht (side scatter)ZeitTabelleTRIS-Borat-EDTA-PufferTris gepufferte Saline (Tris Buffered Saline)T-ZellrezeptorTransforming Growth FactorT HelferT-cell immunoglobulin domain and mucin
SIGIRR SLE SMA SNP SSC t Tab. TBE TBE TBS TCR TGF Th Tim-3	single-immunoglobulin interleukin-1 receptor-related Systemischer Lupus Erythematodes Autoantikörper gegen die glatte Muskulatur (smooth muscle antibody) Single Nucleotide Polymorphism Seitwärtsstreulicht (side scatter) Zeit Tabelle TRIS-Borat-EDTA-Puffer Tris gepufferte Saline (Tris Buffered Saline) T-Zellrezeptor Transforming Growth Factor T Helfer T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3
SIGIRR SLE SMA SNP SSC t Tab. TBE TBE TBS TCR TGF Th Tim-3 TLR	single-immunoglobulin interleukin-1 receptor-related Systemischer Lupus Erythematodes Autoantikörper gegen die glatte Muskulatur (smooth muscle antibody) Single Nucleotide Polymorphism Seitwärtsstreulicht (side scatter) Zeit Tabelle TRIS-Borat-EDTA-Puffer Tris gepufferte Saline (Tris Buffered Saline) T-Zellrezeptor Transforming Growth Factor T Helfer T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3 Toll-Like-Rezeptor
SIGIRR SLE SMA SNP SSC t Tab. TBE TBE TBS TCR TGF Th Tim-3 TLR TMB	single-immunoglobulin interleukin-1 receptor-related Systemischer Lupus Erythematodes Autoantikörper gegen die glatte Muskulatur (smooth muscle antibody) Single Nucleotide Polymorphism Seitwärtsstreulicht (side scatter) Zeit Tabelle TRIS-Borat-EDTA-Puffer Tris gepufferte Saline (Tris Buffered Saline) T-Zellrezeptor Transforming Growth Factor T Helfer T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3 Toll-Like-Rezeptor Tetramethylbenzidin
SIGIRR SLE SMA SNP SSC t Tab. TBE TBE TBS TCR TGF Th Tim-3 TLR TMB TNF	single-immunoglobulin interleukin-1 receptor-related Systemischer Lupus Erythematodes Autoantikörper gegen die glatte Muskulatur (smooth muscle antibody) Single Nucleotide Polymorphism Seitwärtsstreulicht (side scatter) Zeit Tabelle TRIS-Borat-EDTA-Puffer Tris gepufferte Saline (Tris Buffered Saline) T-Zellrezeptor Transforming Growth Factor T Helfer T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3 Toll-Like-Rezeptor Tetramethylbenzidin Tumor Nekrosefaktor
SIGIRR SLE SMA SNP SSC t Tab. TBE TBE TBS TCR TGF Th Tim-3 TLR TMB TNF Treg	single-immunoglobulin interleukin-1 receptor-related Systemischer Lupus Erythematodes Autoantikörper gegen die glatte Muskulatur (smooth muscle antibody) Single Nucleotide Polymorphism Seitwärtsstreulicht (side scatter) Zeit Tabelle TRIS-Borat-EDTA-Puffer Tris gepufferte Saline (Tris Buffered Saline) T-Zellrezeptor Transforming Growth Factor T Helfer T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3 Toll-Like-Rezeptor Tetramethylbenzidin Tumor Nekrosefaktor regulatorische T-Zelle
SIGIRR SLE SMA SNP SSC t Tab. TBE TBE TBS TCR TGF Th Tim-3 TLR TMB TNF Treg Tris	single-immunoglobulin interleukin-1 receptor-related Systemischer Lupus Erythematodes Autoantikörper gegen die glatte Muskulatur (smooth muscle antibody) Single Nucleotide Polymorphism Seitwärtsstreulicht (side scatter) Zeit Tabelle TRIS-Borat-EDTA-Puffer Tris gepufferte Saline (Tris Buffered Saline) T-Zellrezeptor Transforming Growth Factor T Helfer T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3 Toll-Like-Rezeptor Tetramethylbenzidin Tumor Nekrosefaktor regulatorische T-Zelle Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
SIGIRR SLE SMA SNP SSC t Tab. TBE TBE TBS TCR TGF Th Tim-3 TLR TMB TNF Treg Tris TSDR	single-immunoglobulin interleukin-1 receptor-related Systemischer Lupus Erythematodes Autoantikörper gegen die glatte Muskulatur (smooth muscle antibody) Single Nucleotide Polymorphism Seitwärtsstreulicht (side scatter) Zeit Tabelle TRIS-Borat-EDTA-Puffer Tris gepufferte Saline (Tris Buffered Saline) T-Zellrezeptor Transforming Growth Factor T Helfer T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3 Toll-Like-Rezeptor Tetramethylbenzidin Tumor Nekrosefaktor regulatorische T-Zelle Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Treg-spezifische demethylierte Region
SIGIRR SLE SMA SNP SSC t Tab. TBE TBS TCR TGF Th Tim-3 TLR TMB TNF Treg Tris TSDR U	single-immunoglobulin interleukin-1 receptor-related Systemischer Lupus Erythematodes Autoantikörper gegen die glatte Muskulatur (smooth muscle antibody) Single Nucleotide Polymorphism Seitwärtsstreulicht (side scatter) Zeit Tabelle TRIS-Borat-EDTA-Puffer Tris gepufferte Saline (Tris Buffered Saline) T-Zellrezeptor Transforming Growth Factor T Helfer T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3 Toll-Like-Rezeptor Tetramethylbenzidin Tumor Nekrosefaktor regulatorische T-Zelle Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Treg-spezifische demethylierte Region Units

UDCA	Ursodesoxycholsäure
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
VCAM	Vascular cell adhesion protein
VS	versus
W	weiblich
z.B.	zum Beispiel

9 Publikationen

Katt, J, Schwinge D, <u>Schoknecht T</u>, Quaas A, Sobottka I, Burandt E, Becker C, Neurath MF, Lohse AW, Herkel J, Schramm C. Increased T helper type 17 response to pathogen stimulation in patients with primary sclerosing cholangitis. Hepatology 58, 1084-1093, doi:10.1002/hep.26447 (2013).

Sebode M, Peisler M, Franke B, Schwinge D, <u>Schoknecht T</u>, Wortmann F, Quaas A, Petersen BS, Ellinghaus E, Baron U, Olek S, Wiegard C, Weiler-Normann C, Lohse AW, Herkel J, Schramm C. Reduced FOXP3 regulatory T cells in patients with primary sclerosing cholangitis are associated with IL2RA gene polymorphisms. Journal of hepatology, doi:10.1016/j.jhep.2013.12.027 (2014)

10 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Lohse möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, in seinem Labor die vorliegende Doktorarbeit anfertigen zu dürfen.

Frau Prof. Dr. Dobler danke ich für die Begutachtung dieser Arbeit und ihre Bereitschaft zusätzlich die Begutachtung der Disputation zu übernehmen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Schramm für die außerordentlich gute Betreuung meiner Doktorarbeit, den Freiraum bei der Gestaltung des Projekts und das Vertrauen in meine Fähigkeiten. Auch wenn es mal nicht so gut lief, blieb er stets geduldig und fand die richtigen Worte, um mich zu ermutigen.

Ebenso danke ich Herrn PD Dr. Johannes Herkel. Seine Tür stand stets offen, so dass man mit Fragen und Problemen immer zu ihm kommen konnte. Auch bei der Erstellung dieser Arbeit war er eine große Unterstützung.

Bei unseren technischen Assistenten möchte ich mich für ihre bereitwillige Hilfe bei allen Problemen des Laboralltags bedanken. Insbesondere möchte ich hierbei Marko Hilken danken, der fast jeden Dienstagmorgen einen Anruf von mir bekam und stets bei Computerproblemen mit Rat und Tat zur Seite stand. Auch Christina Trabandt und Agnes Malotta gebührt ein großer Dank, da sie einem jederzeit hilfreich unter die Arme griffen, wenn der Berg an Arbeit immer größer wurde.

Natürlich möchte ich mich auch bei allen anderen Kollegen für die gute Zusammenarbeit, die schöne Atmosphäre und die gemeinsamen Aktivitäten inner- und außerhalb des Labors bedanken. Hierbei ist besonders Dorothee Schwinge zu erwähnen, die mir eine große Hilfe bei der Erstellung dieser Doktorarbeit war.

Ein ganz besonderer Dank gilt Jessica Rauch, Claudia Bovensiepen, Nina Günther und Jan-Hendrik Kozik für ihre Freundschaft und die gemeinsame Zeit. Zusammen haben wir alle Höhen und Tiefen unserer Doktorandenzeit gemeistert. Außerdem danke ich meinen Freunden außerhalb des Labors, die mich immer mit offenen Armen empfangen haben. Dabei besonders Hanna Wörner, Kristina Wilshusen, Bettina Meyer, Victoria Schwarke und Janina Guder, mit denen ich so manche Lasagne geteilt habe.

Meiner Familie danke ich für ihre absolute Unterstützung und ihr volles Vertrauen darin, dass ich meinen Weg schon gehen werde.

Schließlich danke ich vom ganzen Herzen meinem Freund Daniel Piskorz. Er war mir eine große Stütze und hielt mir den Rücken in jeder Hinsicht frei.

11 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ort/ Datum

Unterschrift