

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

I. Medizinische Klinik und Poliklinik

Prof. Dr. med. Ansgar W. Lohse

Plastizität regulatorischer T-Zellen bei autoimmunen Lebererkrankungen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Leona Jansing
geboren in Dülmen

Hamburg 2024

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 14.10.2024

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. Johannes Herkel

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Immunregulation	1
1.1.1	Immunabwehr	1
1.1.2	Immunologische Toleranz.....	4
1.1.3	Regulatorische T-Zellen.....	5
1.1.4	Vorstellung der untersuchten molekularen Strukturen.....	12
1.1.5	Autoimmunität.....	16
1.1.6	Inflammation und Regulation in der Leber.....	18
1.2	Autoimmune Lebererkrankungen.....	18
1.2.1	Autoimmunhepatitis	18
1.2.2	Primär sklerosierende Cholangitis und primär biliäre Cholangitis	22
1.3	Zielsetzung der Dissertation	23
2	Material und Methoden	25
2.1	Material	25
2.2	Medien und Puffer.....	28
2.3	Humanes Probenmaterial	28
2.3.1	Differenzierung nach Krankheitsaktivität	30
2.3.2	Differenzierung nach Immunsuppression	32
2.3.3	Differenzierung nach Steroideinnahme	33
2.4	Methoden	34
2.4.1	Studienkonzept.....	34
2.4.2	Stimulation	34
2.4.3	Färbung	35
2.4.4	Durchflusszytometrie	37
2.4.5	Gating Strategie.....	38
2.4.6	Statistische Auswertung	39
3	Ergebnisse.....	41
3.1	Versuchsauswertung	41
3.1.1	Anteil der T _{regs} an der Gesamtpopulation der T-Lymphozyten.....	41
3.1.2	T _{reg} -spezifische Expression der untersuchten Oberflächenproteine.....	44
3.1.3	T _{reg} -spezifische Expression der untersuchten Transkriptionsfaktoren.....	48
3.1.4	T _{reg} -spezifische Expression der untersuchten Zytokine.....	50
3.2	Korrelationsanalyse der klinischen Parameter.....	53
3.3	Subgruppenanalysen.....	57
3.3.1	Überprüfung der AIH-Kohorte hinsichtlich des Einflusses einer Immunsuppression auf den Phänotyp der T _{regs}	57
3.3.2	Überprüfung der AIH-Kohorte hinsichtlich des Einflusses einer Steroideinnahme auf den Phänotyp der T _{regs}	59
4	Diskussion	61
4.1	Hinweise für eine möglicherweise veränderte T _{reg} -Funktion zeigen sich lediglich im akuten Erkrankungsstadium der AIH.....	61
4.2	Ein Einfluss einer medikamentösen Immunsuppression auf die Expression konnte für den Großteil der untersuchten T _{reg} -Marker nicht beobachtet werden.....	73
4.3	Limitationen.....	74
4.4	Ausblick.....	75

5	Zusammenfassung	78
6	Abkürzungsverzeichnis.....	80
7	Tabellenverzeichnis.....	82
8	Abbildungsverzeichnis.....	83
9	Literaturverzeichnis.....	84
10	Danksagung.....	103
11	Lebenslauf	104
12	Eidesstattliche Versicherung	105

1 Einleitung

1.1 Immunregulation

Das Immunsystem umfasst die Abwehrmechanismen gegen Substanzen und Organismen, mit denen der menschliche Körper in Kontakt kommt. Physiologisch werden körperfremde und potenziell schädliche Reize (Antigene) identifiziert und unschädlich gemacht, während körpereigene und ungefährliche Strukturen wie beispielsweise das Mikrobiom toleriert werden. Man spricht dementsprechend von immunologischer Abwehr und Toleranz, die durch verschiedene Mediatoren beziehungsweise Effektor-Mechanismen erreicht und im Gleichgewicht gehalten werden (Murphy und Weaver, 2018).

1.1.1 Immunabwehr

Die Immunabwehr setzt sich aus zwei aufeinander aufbauenden Komponenten zusammen – der angeborenen und der erworbenen Immunität, die sich in ihrer Spezifität, Reaktionsgeschwindigkeit und den beteiligten Zelltypen unterscheiden. Dabei kann der Organismus innerhalb einer jeweiligen Immunantwort beide Komponenten interaktiv und sequenziell nutzen (Parkin und Cohen, 2001). Die Bereitstellung und Differenzierung der Immunzellen erfolgt durch die primären und sekundären lymphatischen Organe. Eine weitere wichtige Rolle spielt die Leber, die unter anderem immunologisch aktive Proteine synthetisiert, wie die Akute-Phase-Proteine (Gabay und Kushner, 1999).

Die angeborene Immunantwort steht dem Organismus von Geburt an zur Verfügung. Zelluläre und nicht-zelluläre – so genannte humorale – Bestandteile ermöglichen eine schnelle jedoch unspezifische Immunreaktion. Zu den angeborenen Elementen des Immunsystems zählen insbesondere Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Antigen-präsentierende Zellen (APC), Komplement, Zytokine und Akute-Phase-Proteine (Parkin und Cohen, 2001).

Eine Immunantwort kann zum Beispiel von Bestandteilen bakterieller Erreger wie etwa Lipopolysacchariden ausgelöst werden, oder durch einen quantitativen Anstieg körpereigener Signalmoleküle wie Adenosintriphosphat (ATP). Diese Reize werden von einer begrenzten Anzahl Rezeptoren auf Makrophagen, Neutrophilen oder dendritischen Zellen erkannt, die wiederum Moleküle sezernieren, die ihrerseits als Entzündungssignal (Zytokine und Chemokine) oder cytotoxisch wirken – also unmittelbar schädlich auf identifizierte zelluläre Ziele (Murphy und Weaver, 2018).

Zytokine sind Signalmoleküle, die die Reaktion von Zellen beeinflussen, die den jeweils spezifischen Zytokin-Rezeptor exprimieren und über dessen Bindung einen Effektor-Mechanismus der jeweiligen Zelle verstärken. Chemokine hingegen rekrutieren über entsprechende Chemokinrezeptoren Zellen zu spezifischen Geweben und entzündeten Strukturen (Adams und Lloyd, 1997).

Die erworbene oder auch adaptive Immunantwort wird auf einen Stimulus hin initiiert und erfolgt sehr effektiv, da die Reaktion äußerst zielgerichtet ist. Effektorzellen der adaptiven Immunität sind Lymphozyten. Man unterscheidet B- und T-Lymphozyten, die beide aus den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks hervorgehen. B-Lymphozyten verbleiben für ihre Differenzierung dort, T-Lymphozyten wandern in den Thymus ein. Dort reifen sie von T-Vorläuferzellen, denen die späteren Oberflächenproteine Cluster of Differentiation (CD) 4 und CD8 sowie der T-Zell-Rezeptor (TCR) noch fehlen, zu doppeltpositiven ($CD4^+/CD8^+$) Zellen, die mit dem Thymusepithel interagieren (Takahama, 2006). T-Zellen, die eine zu geringe oder aber überschießende Affinität zum Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) zeigen, werden in aufeinander folgenden Prozessen positiver und negativer Selektion identifiziert und sterben (Takaba und Takayanagi, 2017). Damit sollen nicht-funktionale sowie autoreaktive T-Zellen verhindert werden. Übrig bleiben T-Zellen mit moderater MHC-Affinität. Hat eine dieser Zellen mit ihrem vorhandenen TCR eine höhere Affinität zur MHC-I-Klasse, wird sie zur $CD4^+/CD8^+$ zytotoxischen T-Zelle, überwiegt die Affinität zu MHC-II, verlässt die Zelle den Thymus als $CD4^+/CD8^-$ T-Helferzelle (T_H) (Bonilla und Oettgen, 2010, Klein et al., 2009).

Die Lymphozyten sind zunächst naiv, also noch mit keinem Antigen in Berührung gekommen. Erst nachdem sie in den peripheren Lymphorganen – beispielsweise in einem Lymphknoten – ein spezifisches Antigen über ihren jeweiligen Rezeptor erkannt haben, werden sie zu funktionalen Effektorzellen (Luckheeram et al., 2012). Während aktivierte B-Zellen hauptsächlich Antikörper-produzierende Plasmazellen und Gedächtniszellen bilden, welche die Grundlage für ein Immungedächtnis sind, differenzieren sich aktivierte T-Zellen weiter in verschiedene Subklassen. Die Differenzierung ist dabei abhängig von verschiedenen Stimuli, etwa Zytokinen, Antigenen oder co-stimulatorischen Signalen (Tao et al., 1997, Luckheeram et al., 2012).

Im Folgenden soll im Sinne der Zielsetzung dieser Arbeit eine kurze Übersicht ausschließlich über $CD4^+$ T-Zell-Subklassen gegeben werden. Eine grobe Unterteilung kann in regulatorische T-Zellen (T_{regs}), die in Kapitel 1.1.3 separat beschrieben sind, und Effektor-T-Zellen (T_{effs}) erfolgen. Zu Letzteren gehören T_H1 -, T_H2 - und T_H17 -Zellen.

Darüber hinaus konnten auch T_H22 -, T_H9 - und folliculäre T-Helfer-Zellen abgegrenzt werden, die hier nur am Rande erwähnt seien.

Effektor-T-Zellen

T_H1 -Lymphozyten differenzieren sich unter dem Einfluss von Interleukin 12 (IL-12) und Interferon γ ($IFN\gamma$) und werden reguliert durch den Master-Transkriptionsfaktor T-bet (Afkarian et al., 2002, Trinchieri et al., 2003). Sie sezernieren unter anderem $IFN\gamma$ und IL-2 und üben darüber ihre Effektor-Funktion aus, die in der Steigerung der Phagozytose durch beispielsweise Makrophagen sowie der Zytolyse durch $CD8^+$ Lymphozyten besteht (Kim et al., 2006, Boehm et al., 1997). Darüber hinaus unterstützt das IL-2-Signal die Entwicklung von Gedächtniszellen und wirkt indirekt auch supprimierend, indem es die Expression von Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3), dem Mastertranskriptionsfaktor der T_{regs} , induziert (Wuest et al., 2008, Williams et al., 2006).

Während T_H1 -Zellen charakteristisch für die Immunantwort gegen intrazelluläre Erreger sind, spielen T_H2 -Zellen vor allem bei der Abwehr von extrazellulären Parasiten und Toxinen, aber auch im Rahmen von allergischen Reaktionen eine Rolle (Del Prete, 1992). Sie differenzieren sich unter dem Einfluss von IL-2 und IL-4 und werden vor allem durch die Expression von GATA3 reguliert (Kaplan et al., 1996, Glimcher und Murphy, 2000, Horiuchi et al., 2011). Zu den Effektor-Zytokinen der T_H2 -Zellen zählen IL-4 und IL-5, über die sie mit B-Lymphozyten und Eosinophilen interagieren sowie die Ausschüttung weiterer pro-inflammatorischer Moleküle auslösen (Luckheeram et al., 2012).

In Abhängigkeit von IL-6, IL-21 und IL-23 sowie dem Transforming growth factor β ($TGF\beta$) können sich T-Lymphozyten zu T_H17 -Zellen differenzieren (Veldhoen et al., 2006, Volpe et al., 2008). Diese spielen eine Rolle für die Mukosa-assoziierte Immunabwehr und agieren vor allem gegen extrazelluläre Pathogene, sodass sie insbesondere zur Abwehr von Pilzinfektionen beitragen (Khader et al., 2009). Der Mastertranskriptionsfaktor der T_H17 -Zellen ist retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma-T ($ROR\gamma_t$) (Ivanov et al., 2006). Effektor-Zytokine sind unter anderem IL-17A und IL-17F, die über einen gemeinsamen Rezeptor agieren und eine ähnliche Wirkung vermitteln, sowie IL-21 und IL-22 (Gaffen, 2009, Luckheeram et al., 2012). Über eine Kaskade weiterer Entzündungssignale wird so die pro-inflammatorische Wirkung der T_H17 Zellen vermittelt und weitere, insbesondere neutrophile Entzündungszellen werden über Chemotaxis rekrutiert (Onishi und Gaffen, 2010, Gaffen et al., 2014).

1.1.2 Immunologische Toleranz

Die zuvor beschriebenen Immunmechanismen schützen den Körper gegen potenzielle Schädigung. Im Gegensatz dazu müssen ungefährliche Reize als solche identifiziert und eine überschießende Immunreaktion sollte eingegrenzt werden.

Man nimmt an, dass der Ausbildung und Aufrechterhaltung immunologischer Toleranz mehrere Mechanismen zugrunde liegen: zentrale Toleranz, periphere Toleranz, die Homöostase verschiedener inflammatorischer und anti-inflammatorischer Zytokine und Chemokine sowie die Wirkung regulatorischer T-Zellen (Wang et al., 2015).

Zentrale Toleranz wird, wie in Kapitel 1.1.1 bereits im Rahmen der Lymphozyten-Differenzierung erklärt, über die negative Selektion im Thymus erreicht. Dort interagieren T-Lymphozyten über den TCR mit APCs, die über MHC-I und MHC-II körpereigene Antigene präsentieren. Erkennt die T-Zelle die präsentierten Antigene mit hoher Affinität, stirbt sie durch Apoptose (Xing und Hogquist, 2012, Mouchess und Anderson, 2014). Trotzdem können bis zu 40% der autoreaktiven Zellen – insbesondere solche, die körpereigene Antigene mit mittlerer Affinität erkennen – diesem Mechanismus entgehen und gelangen in die Peripherie (Bouneaud et al., 2000). Dort gibt es weitere Mechanismen autoreaktive Effektor-Zellen in einen anergischen Zustand zu versetzen oder ihren kontrollierten Zelltod zu induzieren (EITanbouly und Noelle, 2021).

In der Peripherie kann die Reaktion einer Effektorzelle beim Erkennen eines Antigens durch die Wirkung unterschiedlicher Signalmoleküle beeinflusst werden. Es gibt Zytokine, die für eine pro- oder anti-inflammatorische Wirkung bekannt sind, ihr Effekt hängt aber auch von der Kombination anderer ebenfalls beteiligter Zytokine ab. Zu den vorrangig pro-inflammatorischen Zytokinen zählen $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$, die beispielsweise von cytotoxischen T-Zellen ausgeschüttet werden. IL-10 und $TGF\beta$ hingegen werden zu den suppressiven Zytokinen gezählt (Murphy und Weaver, 2018). Zusammen mit IL-6, IL-21 und IL-23 begünstigt $TGF\beta$ die Entwicklung von T_H17 -Effektorzellen. Ohne diese zusätzlichen Stimuli fördert $TGF\beta$ hingegen die Differenzierung regulatorischer T-Zellen (Veldhoen et al., 2006, Bettelli et al., 2006), die sich wiederum im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Effektor-T-Zellen selbst durch eine immun-regulative Wirkung auszeichnen. So tragen T_{regs} ebenfalls zur Aufrechterhaltung der Toleranz und Kontrolle inflammatorischer Prozesse bei.

Im Folgenden wird auf die regulatorischen T-Zellen als Hauptuntersuchungsgegenstand dieser Arbeit genauer eingegangen.

1.1.3 Regulatorische T-Zellen

Erste Erkenntnisse darüber, dass T-Zellen nicht nur eine pro-inflammatorische sondern auch immunsuppressive Wirkung ausüben könnten und sich die entsprechenden Lymphozyten von den bis dahin bekannten Effektorzellen unterscheiden, wurden bereits 1970 beschrieben (Gershon und Kondo, 1970). Erst 1995 gelang hingegen die genauere Eingrenzung der T_{regs} als $CD4^+CD25^+$ Subpopulation. Darauf aufbauend konnten auch Hinweise auf den Zusammenhang zwischen T_{reg} -Dysfunktion und dem Auftreten von Autoimmunerkrankungen gefunden werden (Sakaguchi et al., 1995, Asano et al., 1996). In den darauffolgenden Jahrzehnten wurden viele weitere strukturelle und funktionelle Eigenschaften der T_{regs} entdeckt, die für ihre Identifizierung, Isolierung und gezielte Erforschung eine Rolle spielen, wie etwa die Identifizierung des Mastertranskriptionsfaktors FoxP3 (Hori et al., 2003). Neben den klassischen FoxP3⁺ T_{regs} gibt es FoxP3⁻ T-Zellen, die sich ebenfalls durch eine suppressive Wirkung auszeichnen – wie beispielsweise T_{r1} - und T_{H3} -Zellen – auf die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter eingegangen wird (Cong et al., 2002, Jonuleit et al., 2002).

1.1.3.1 Identifikation

Die Phänotypisierung von Immunzellen erfolgt im Allgemeinen über Oberflächenmerkmale, so genannte *Cluster of Differentiation*, bei denen es sich meistens um Glykoproteine handelt (Murphy und Weaver, 2018). Regulatorische T-Zellen sind $CD4^+$ T-Lymphozyten, die sich durch den Transkriptionsfaktor FoxP3 auszeichnen. Darüber hinaus zeigen sie eine hohe Expression der alpha-Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) sowie eine geringe Expression von CD127, der alpha-Kette des IL-7 Rezeptors. Insbesondere in älteren Studien wurden T_{regs} allein anhand ihrer Positivität für CD4 und CD25 identifiziert (Longhi et al., 2006, Jonuleit et al., 2001, Valencia et al., 2006). Eine spezifischere Selektion der T_{regs} , die im Rahmen dieser Arbeit angewendet wurde, erfolgt über CD45, CD4, FoxP3, CD25 und CD127.

CD45 (auch Leucocyte Common Antigen, LCA) wird auf Leukozyten exprimiert und ist an der Entwicklung von T-Zellen beteiligt. Über eine Glykosylierung von CD45 wird das Überleben, die Aktivierung und Immunfunktion der T-Zellen beeinflusst (Earl und Baum, 2008).

CD4 wird vor allem auf T-Helferzellen exprimiert. Es dient als Co-Rezeptor des T-Zell-Rezeptors und ist an der T-Zell-Aktivierung und Bindung von MHC-II-Molekülen beteiligt (Rudd et al., 1988).

Bei CD25 handelt es sich um die α -Kette des IL-2-Rezeptors. Bereits 1995 konnte die Rolle von CD25 für die Ausprägung der Immuntoleranz nachgewiesen werden (Sakaguchi et al., 1995). So zeichnen sich T_{regs} durch eine hohe Expression von CD25 aus, jedoch können auch aktivierte T_{effs} CD25 exprimieren. Durch die α -Kette wird die Affinität des IL-2 Rezeptors für seinen Liganden erhöht, und die Reagibilität der T-Zelle auf bereits geringe Mengen IL-2 gesteigert (Murphy und Weaver, 2018).

CD127 bezeichnet die α -Kette des IL-7-Rezeptors. Eine geringe beziehungsweise fehlende Ausprägung dieses Markers konnte als charakteristisch für regulatorische T-Zellen identifiziert werden und hilft, sie von aktivierten T_{effs} , die ebenfalls CD25 exprimieren, zu unterscheiden (Yu et al., 2012, Hartigan-O'Connor et al., 2007).

Der entscheidende, sogenannte Mastertranskriptionsfaktor der T_{regs} ist FoxP3. Da es sich um ein intranukleäres Protein handelt, ist die Markierung aufwändiger und erfordert eine vorherige Permeabilisierung der Zellen. In der Literatur finden sich Arbeiten, die auf die Anfärbung FoxP3s verzichten und stattdessen die T_{regs} lediglich über die beschriebenen Oberflächenmarker identifizieren (Okumura et al., 2008, Longhi et al., 2006, Longhi et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass FoxP3 vorübergehend auch von konventionellen T-Zellen exprimiert werden kann und reicht daher wiederum als einziger Marker zur T_{reg} -Identifikation nicht aus (Walker et al., 2003).

Der folgende Abschnitt soll einen Überblick über die Entstehung und Wirkung der T_{regs} im menschlichen Organismus sowie über die Folgen einer pathologisch veränderten T_{reg} -Funktion geben.

1.1.3.2 Charakteristika und Bedeutung

Regulatorische T-Zellen leisten einen entscheidenden Beitrag zur Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts zwischen Abwehr und Toleranz (Sakaguchi et al., 2020). Man unterscheidet *in vivo* zwei Arten von T_{regs} , die insgesamt etwa 5-10% der im peripheren Blut vorkommenden T-Zellen ausmachen (Seddiki et al., 2006). Zum einen gibt es natürliche T_{regs} (nT_{regs}), die den größten Anteil darstellen und bereits im Thymus aktiviert werden. Dort werden sie von APCs über deren MHC-Rezeptor mit Auto-Antigenen konfrontiert. Zeigt ein TCR eine intermediäre Affinität zu einem Autoantigen (also einer körpereigenen Struktur) entwickelt sich die T-Zelle zu einer T_{reg} mit entsprechender Antigen-Spezifität. Ist der TCR hingegen hoch affin für ein Auto-Antigen stirbt die T-Zelle. T-Zellen mit niedriger Autoantigen-Affinität verlassen den Thymus als naive T-Zellen (Hsieh et al., 2012). Aus naiven T-Zellen kann bei Erkennen ihres Antigens in der Peripherie, entweder eine T_{eff} oder aber eine periphere T_{reg} (pT_{reg}) entstehen. pT_{regs}

entwickeln sich, wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben, unter dem Einfluss von TGF β . Während nT_{regs} den Mastertranskriptionsfaktor FoxP3 bereits von Beginn an exprimieren, erlangen pT_{regs} die FoxP3-Expression erst unter der Stimulation durch TGF β (Chen et al., 2003). Differenzieren sich T_{regs} *in vitro* durch TGF β -Einfluss so spricht man von induzierten T_{reg} (iT_{reg}).

Der Transkriptionsfaktor FoxP3 spielt eine entscheidende Rolle für die T_{reg}-Funktion. Er wurde erstmals von Russell (1951) erwähnt und seine Mutation in Mäusen vom *scurfy*-Typ nachgewiesen. Dieser Zusammenhang verlieh FoxP3 auch die Bezeichnung *Scurfin*. FoxP3 wird vor allem in CD4⁺ T_{regs} exprimiert (Fontenot et al., 2003). Auch ein retroviraler Transfer des FoxP3-Gens, welches das dominierende regulatorische Gen für die T_{reg}-Differenzierung darstellt, kann naive T-Zellen zu T_{regs} konvertieren (Hori et al., 2003). Die X-chromosomal rezessive FoxP3-Mutation einer *scurfy*-Maus führt hingegen zu einer letalen Überproliferation von CD4⁺ Effektor-T-Zellen sowie einer gesteigerten Zytokin-Expression (Godfrey et al., 1991). Eine FoxP3-Defizienz kann somit ursächlich sein für Autoimmunität – auch im menschlichen Organismus (Brunkow et al., 2001, Wildin et al., 2001, Bennett et al., 2001). Dort äußert sich eine X-chromosomal vermittelte, fehlende oder geringe FoxP3-Expression in einer Immundysregulation, Polyendokrinopathie und Enteropathie – ein Syndrom, das als IPEX bezeichnet wird (Bennett et al., 2001). Generell konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen zu Autoimmunreaktionen führt (Itoh et al., 1999, Grant et al., 2015). Bei Patient:innen mit Multipler Sklerose (MS), einer autoimmunen chronisch-entzündlichen Erkrankung des zentralen Nervensystems, ist der Anteil von FoxP3⁺ T_{regs} variabler als bei Gesunden. Die FoxP3-Intensität, welche einen Hinweis auf die Anzahl der Moleküle pro Zelle gibt, ist bei MS signifikant niedriger (Sambucci et al., 2018). Eine FoxP3-Überexpression hingegen konnte krankheitsunabhängig mit einer verringerten T-Zell-Antwort in Verbindung gebracht werden (Kasprowicz et al., 2003).

Die Wirkung regulatorischer T-Zellen liegt also wie beschrieben vor allem in der Begrenzung inflammatorischer Prozesse. Das Konzept der Autoimmunität als Ausdruck fehlgesteuerter Immunregulation wird in Kapitel 1.1.5 weiterführend beleuchtet. Neben ihrer Bedeutung hinsichtlich der Verhinderung von Autoimmunerkrankungen spielen T_{regs} auch eine Rolle im Kontext von Tumor- und Transplantationsimmunologie, Allergien oder immunmetabolischen Erkrankungen wie beispielsweise der Arteriosklerose. Ihre klinische Anwendbarkeit für eine Vielzahl von Indikationen ist daher aktuell Gegenstand der Forschung (Lee et al., 2005, Hansson und Hermansson, 2011, Tanchot et al., 2013, Noval Rivas und Chatila, 2016).

Die immunsuppressiven Mechanismen regulatorischer T-Zellen auf molekularer Ebene sind zahlreich (Vignali et al., 2008, Shevach, 2009). Sie reichen von der Ausschüttung cytotoxischer Substanzen und anti-inflammatorischer Zytokine, über Zell-Zell-Interaktionen hin zu Mechanismen, die den Zellmetabolismus beeinflussen. Über diese Wege interagieren T_{regs} sowohl mit anderen T-Zellen als auch mit APCs.

Über die Ausschüttung von cytotoxischem Granzym B sowie Perforin können T_{regs} das Sterben von Effektorzellen wie etwa natürlichen Killerzellen oder $CD8^+$ T-Lymphozyten einleiten (Cao et al., 2007). Zu den charakteristischen anti-inflammatorischen Zytokinen der T_{regs} hingegen zählen $TGF\beta$ und IL-10, über deren Sekretion insbesondere T_{effs} aber auch dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen gehemmt werden können (Moore et al., 2001, Strauss et al., 2007, Couper et al., 2008, Hoffman et al., 2011). Ebenso trägt das sezernierte $TGF\beta$ zur weiteren Entwicklung peripherer T_{regs} aus naiven T-Zellen bei.

Darüber hinaus benötigen T_{regs} zur Differenzierung und Stabilisierung IL-2. Die auf T_{regs} vorhandene α -Kette CD25 macht den IL-2 Rezeptor affiner für seinen Liganden IL-2. Dadurch können T_{regs} vorrangig IL-2 konsumieren, wodurch ein IL-2 Mangel für die umliegenden Effektorzellen entsteht und ihre inflammatorische Aktivität geschwächt wird (Zorn et al., 2006).

Bei den Zell-Zell-vermittelten Mechanismen der T_{regs} handelt es sich um Signale über inhibitorische Rezeptoren wie *programmed cell death protein 1* (PD-1) und *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA-4), die neben weiteren Strukturen im Rahmen dieser Arbeit untersucht und in Kapitel 1.1.4.1 nochmals gesondert vorgestellt werden. Gleiches gilt für CD39, welches freies Adenosintriphosphat (ATP) spaltet. ATP entfaltet als „natürliches Adjuvans“ (Borsellino et al., 2007) eine pro-inflammatorische Wirkung im Organismus und wird durch CD39 entsprechend abgebaut. Damit repräsentiert CD39 einen Mechanismus, der das Mikromilieu einer ablaufenden Entzündung beeinflusst.

Eine exemplarische Darstellung der Wirkung regulatorischer T-Zellen ist in Abbildung 1 gezeigt.

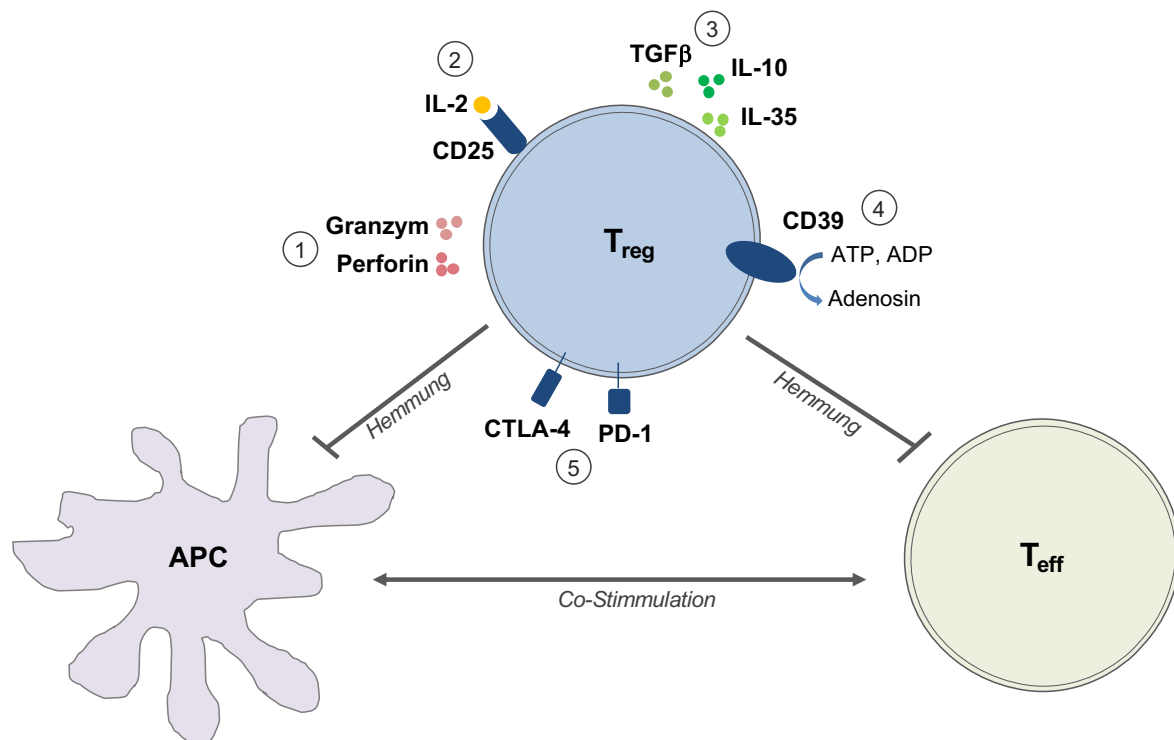


Abbildung 1: Exemplarische Darstellung regulatorischer Mechanismen einer T_{reg} .
 Regulatorische T-Zellen (T_{regs}) interagieren sowohl mit anderen T-Zellen als auch mit Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) über vielfältige Mechanismen: 1) Über die Ausschüttung von Granzymen und Perforinen kann der Tod von Effektorzellen vermittelt werden. 2) Auch über den Verbrauch von Interleukin (IL) -2, das somit anderen Zellarten in geringerem Maße zur Verfügung steht, wird die Immunreaktion beeinflusst. 3) Des Weiteren schütten T_{regs} die anti-inflammatorischen Zytokine Transforming growth factor (TGF) β , IL-10 und IL-35 aus. 4) Membrangebundenes CD39 spaltet freies Adenosintriphosphat (ATP), welches als unspezifischer Entzündungsreiz gilt, in Adenosindiphosphat (ADP). 5) Darüber hinaus finden sich auf der Zelloberfläche Rezeptoren wie Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4 (CTLA-4) und Programmed cell death protein 1 (PD-1), über die ein Zell-Zell-Kontakt hergestellt wird, der die Hemmung pro-inflammatorischer Zellen vermittelt.

Die beschriebenen Mechanismen erzielen vor allem eine lokal begrenzte Wirkung. Daher müssen die T_{regs} zum Ort der Entzündung gelangen. Die Migration durch den Organismus und aus dem Blut in periphere Gewebe wird über Chemokin-Rezeptoren (CCR) beeinflusst. Auf der Oberfläche der T_{regs} wurden unterschiedliche Chemokin-Rezeptoren nachgewiesen, darunter CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7 und CXCR4 (Ding et al., 2012).

1.1.3.3 Plastizität

Es wird angenommen, dass T-Zellen auf ein sich veränderndes Milieu reagieren und sich diesem anpassen. Dabei spricht man von T-Zell-Plastizität (Zhou et al., 2009, O'Shea und Paul, 2010). Der Begriff der Plastizität lässt sich auf Zellen im Allgemeinen anwenden. Er wurde zuerst am Beispiel von Muskelzellen beschrieben, deren Untersuchung zeigte, dass die Gen-Expression selbst hochspezialisierter Zellen veränderbar ist (Blau et al., 1985). Später entwickelte sich daraus die These, dass differenzierte Zellen einen

konstanten Kontrollmechanismus benötigen, um einen stabilen Phänotyp zu zeigen (Blau und Baltimore, 1991). Im Gegensatz zu dieser Annahme einer allgemeinen Instabilität beschreibt eine Definition von Bal et al. Plastizität wie folgt: "the capacity of developing cells to change their destiny and of mature cells to change functions and phenotype in response to environmental cues" (Bal et al., 2020).

Auf CD4⁺ T-Zellen bezogen bedeutet Plastizität die Fähigkeit, Eigenschaften unterschiedlicher T-Zell-Subtypen annehmen zu können (DuPage und Bluestone, 2016). Die Steuerung dieser Anpassungsvorgänge erfolgt über die Expression entsprechender Gene unter der Kontrolle von Transkriptionsfaktoren, die wiederum epigenetischen und metabolischen Steuerungsmechanismen unterliegen (Wilson et al., 2009, Shi und Chi, 2019). DuPage und Bluestone (2016) beschreiben einen dreistufigen Vorgang: Ein extrazelluläres Signal erreicht die T-Zelle. Dieses wird über eine zytosolische Signalkaskade in die Zelle getragen. Im Zellkern löst das Signal daraufhin eine veränderte Gen-Expression aus. Daraus resultiert schließlich ein veränderter Phänotyp mit angepasster Funktion.

Um die Stabilität von T_{regs} festzustellen, werden mehrere Charakteristika herangezogen: Auf genetischer beziehungsweise epigenetischer Ebene eine beständige FoxP3-Expression und die hochgradige Demethylierung einer Region innerhalb des FoxP3-Gens, der T_{reg}-spezifischen demethylierten Region (TSDR), die die FoxP3-Expression steuert und in anderen T-Zelllinien methyliert vorliegt (Floess et al., 2007). Auf funktioneller Ebene ist die Stabilität durch eine suppressive Kapazität und die fehlende Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine gekennzeichnet (Urbano et al., 2018).

Bestimmte Konditionen können dazu führen, dass FoxP3⁺ T_{regs} ihre Stabilität teilweise oder ganz verlieren. In einem pro-inflammatorischen Umfeld können T_{regs} sogar selbst zur Entzündung beitragen, statt diese zu regulieren. Das kann für den Organismus problematisch werden, weil die veränderten T_{regs} ihre Autoantigenspezifität vermutlich beibehalten (Williams und Rudensky, 2007).

T_H-like T_{regs}

Je nach lokalem Zytokin-Milieu können T-Zellen mehrere Transkriptionsfaktoren parallel exprimieren. Dadurch entstehen „duale“ T_H-Zellen mit phänotypischen Eigenschaften mehrerer Zelllinien (Ruiz de Morales et al., 2020). Wenn der Phänotyp einer T_{reg} in Richtung Effektor-T-Zelle verändert ist, während weiterhin FoxP3 exprimiert wird, spricht man von T_H-like T_{regs}. Diese lassen sich wiederum je nach charakteristischer Zytokin-Ausschüttung und exprimierten Transkriptionsfaktoren in T_H1-, T_H2- und T_H17-like T_{regs} unterscheiden (Duhon et al., 2012).

T_H1 -like T_{regs} exprimieren neben FoxP3 zusätzlich T-bet. Es wird angenommen, dass dies analog zur T_H1 -Differenzierung über ein $IFN\gamma$ -abhängiges STAT1-Signal initiiert wird (Koch et al., 2009). $IFN\gamma$ kann wiederum von den T_H1 -like T_{regs} ausgeschüttet werden und bestimmt ihre Wirkung mit (Malviya et al., 2022). Man geht davon aus, dass $IFN\gamma^-$ T_H1 -like T_{regs} in der Lage sind, Effektor-Zellen zu supprimieren, und dies insbesondere mit Wirkung auf die T_H1 -Zellen, da sie eine ähnliche Chemokinrezeptor-Expression zeigen und dementsprechend zu Inflammationsgeschehen migrieren, zu denen auch T_H1 -Zellen angezogen werden. $IFN\gamma^+$ T_H1 -like T_{regs} hingegen können ihre supprimierende Funktion nicht vollständig ausführen (Piconese und Barnaba, 2015). Es wird vermutet, dass entsprechende T_H1 -like T_{regs} das Auftreten pathologischer Immunantworten begünstigen. Beispielsweise zeigten Butcher et al. (2016), dass bei Atherosklerose $IFN\gamma^+$ T_H1 -like T_{regs} zu finden waren, die aus *bona fide* (also tatsächlichen) T_{regs} hervorgehen und dysfunktionale Eigenschaften aufweisen.

T_H17 -like T_{regs} exprimieren zusätzlich zu FoxP3 ROR γ t. Dies wird unter IL-6- und TGF β -Einfluss über STAT3 ausgelöst. Über die Expression des Chemokinrezeptors CCR6 gelangen die T_H17 -like T_{regs} gemeinsam mit den T_H17 -Zellen zu entsprechenden Entzündungslokalisationen. Parallel werden vermehrt IL-1 und IL-6 Rezeptoren auf den T_H17 -like T_{regs} ausgebildet, die die T_H17 -Differenzierung fördern und die lokalen IL-1- und IL-6-Spiegel senken. IL-17 wiederum kann von den T_H17 -like T_{regs} in Abhängigkeit des IL-6/STAT3-Signals sezerniert werden (Yang et al., 2008). Die Wirkung dieser IL-17 $^+$ T_{regs} scheint kontextsensitiv zu sein (Malviya et al., 2022). Unterschiedliche Studien konnten sowohl Hinweise auf eine erhaltene als auch unter entzündlichen Bedingungen auf eine geschwächte regulatorische Funktion finden (Beriou et al., 2009, Povolero et al., 2018, Zhu et al., 2019). Auch bei diversen Erkrankungen aus dem autoimmunen Formenkreis konnten IL-17 $^+$ T_H17 -like T_{regs} nachgewiesen werden (Qiu et al., 2020). Sefik et al. (2015) beschrieben für in der Darm-Mukosa durch bestimmte Bakterien induzierte ROR γ t $^+$ IL-17 $^+$ T_H17 -like T_{regs} hingegen eine vorwiegend anti-inflammatorische Wirkung.

Auch T_H2 -like T_{regs} wurden beschrieben, die sich durch die Expression von GATA3 und IRF4 auszeichnen und wiederum IL-4 und IL-13 sezernieren (Krishnamoorthy et al., 2012, Noval Rivas et al., 2015).

T_H -like T_{regs} scheinen folglich wie beschrieben zum einen eine wichtige Rolle bei der zielgerichteten Regulation der ihnen ähnlichen Effektorzellen zu spielen, zum anderen sind sie im inflammatorischen Milieu potenziell in der Lage selbst pro-inflammatorische Zytokine beizusteuern und ihre supprimierende Fähigkeit zumindest teilweise zu verlieren. Die Mechanismen dahinter sind bisher nicht vollständig aufgeklärt. Im Rahmen dieser

Arbeit wurden anhand von IFN γ sowie IL-17 und ROR γ t die T_{regs} von Patient:innen mit Autoimmunhepatitis (AIH) auf einen T_H1- beziehungsweise T_H17-like Phänotypen untersucht. Die Bedeutung dieser Moleküle auf zellulärer Ebene wird zusammen mit den weiteren untersuchten Markern im Folgenden näher beschrieben.

1.1.4 Vorstellung der untersuchten molekularen Strukturen

Die im Zuge dieser Arbeit untersuchten Moleküle bilden einen Ausschnitt der vielfältigen funktionellen Strukturen, die sich auf der Oberfläche und im Innern von T_{regs} befinden und potenziell deren Funktion und Wirkung beeinflussen.

1.1.4.1 Oberflächenmarker

CTLA-4 oder CD152 ist der co-inhibitorische Gegenspieler zum co-stimulatorischen CD28. Beide konkurrieren um die Bindung der Liganden CD80 und CD86 und regulieren über diese Interaktion die T-Zell-Antwort. Im Gegensatz zu CD28, welches sich kontinuierlich auf der Oberfläche von CD4⁺ Zellen befindet, wird CTLA-4 hauptsächlich in intrazellulären Vesikeln gespeichert und nach T-Zell-Aktivierung exprimiert (Brunet et al., 1987, Lenschow et al., 1996). Die Expression von CTLA-4 auf T_{regs} ist hoch und wichtig für die Interaktion mit APCs. Das auf der Oberfläche der T_{regs} exprimierte CTLA-4 bildet mit CD80/CD86 auf den APCs eine Synapse. Da die Affinität von CTLA-4 zu CD80/CD86 die von CD28 der konventionellen T-Zellen übersteigt, wird die Co-Stimulation letzterer geschwächt, da nur begrenzt Bindungsstellen zur Verfügung stehen (Dilek et al., 2013). Darüber hinaus kann CTLA-4 seine Liganden auch durch Transendozytose von der Oberfläche der APCs entfernen (Qureshi et al., 2011). Diese Mechanismen erklären die für CTLA-4 nachgewiesene Rolle bei der Verhinderung von Autoimmunerkrankungen (Tivol et al., 1995). Therapeutisch wird die Blockade von CTLA-4 durch Antikörper für die Induktion einer anti-Tumor-Immunreaktion genutzt (Ribas und Wolchok, 2018).

PD-1 oder CD279 ist wie CTLA-4 ein inhibitorischer Rezeptor, der auf der Oberfläche von T-, B- und myeloischen Zellen vorkommt. Seine Liganden PD-L1 und PD-L2 gehören zur B7-Familie. PD-1 vermindert die über den TCR und CD28 vermittelten Signale und reguliert so die Proliferation und Zytokin-Ausschüttung von T-Zellen (Sharpe und Pauken, 2018). Veränderungen im PD-1 Gen können mit der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen einhergehen und zeigen einen Zusammenhang zwischen PD-1 und dem Erhalt peripherer Toleranz auf (Nishimura et al., 1999, Nishimura et al., 2001). Unter den T-Lymphozyten exprimieren regulatorische T-Zellen PD-1 in einem eher geringen Maß, man geht jedoch davon aus, dass die PD-1-Expression zur suppressiven

Wirkung der T_{regs} beiträgt (Raimondi et al., 2006, Gianhecchi und Fierabracci, 2018). Die Blockade von PD-1 mittels spezifischer Antikörper wird ähnlich wie bei CTLA-4 zur Immuntherapie bei ausgewählten Malignomen verwendet (LaFleur et al., 2018).

Die Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase-1 oder CD39 ist eine Ectonukleotidase, die extrazelluläres Adenosintriphosphat über Adenosindiphosphat (ADP) zu Adenosinmonophosphat (AMP) spaltet und damit inaktiviert. AMP wird von CD73 weiter zu anti-inflammatorischem Adenosin gespalten. ATP selbst ist ein Signalmolekül, das als Mediator von Gewebeschädigung agiert, da es intrazellulär in recht hoher Konzentration vorliegt und bei Zellzerstörung freigesetzt wird (la Sala et al., 2001). Darüber hinaus können Thrombozyten und Entzündungszellen bei ihrer Aktivierung ATP ausschütten (Burnstock und Boeynaems, 2014). Es hat eine pro-inflammatorische Wirkung, indem es Chemotaxis und die Reifung dendritischer Zellen vermittelt (Wilkin et al., 2001, Idzko et al., 2002). Anfangs als Lymphozyten-Aktivierungsmarker deklariert, wurde für CD39 eine wesentliche Expression auf T_{regs} gezeigt (Borsellino et al., 2007). Zusammen mit CD73, das auf T_{regs} co-exprimiert wird, entfernt CD39 also ATP aus dem inflammatorischen Milieu, während das lokale Adenosin zunimmt und eine Modulation der T-Zell Aktivierung bewirkt (Deaglio et al., 2007). Außerdem geht man davon aus, dass CD39 eine stabilisierende Wirkung auf FoxP3, den T_{reg} -Mastertranskriptionsfaktor ausübt (Schenk et al., 2011).

Chemokine Receptor Type 6 (CCR6) oder CD196 ist ein G-Protein-gekoppelter Chemokinrezeptor, der auf der Oberfläche von Lymphozyten – auf $CD4^+$ mehr als auf $CD8^+$ – und dendritischen Zellen sowie auf Zellen lymphoider und nicht-lymphoider Organe (insbesondere Milz, Lymphknoten, Appendix und Pankreas) exprimiert wird (Schutyser et al., 2003). Sein Ligand ist CCL20, auf dessen Bindung hin CCR6 Chemotaxis und Calciumfreisetzung vermittelt (Baba et al., 1997). Während die meisten Chemokinrezeptoren mehrere Liganden haben und viele Liganden wiederum verschiedene Chemokinrezeptoren binden, scheinen CCR6 und CCL20 nach aktuellem Kenntnisstand eine exklusive Spezifität aufzuweisen (Hughes und Nibbs, 2018). Neben der chemotaktischen Wirkung spielt die CCR6-CCL20 Bindung eine Rolle in der mukosalen Immunabwehr und bei der Wundheilung (Cook et al., 2000). Auf $T_{\text{H}}17$ -Zellen und T_{regs} beeinflusst CCR6 die gemeinsame Migration beider Zellarten in entzündete Gewebe. $T_{\text{H}}17$ -Zellen exprimieren zusätzlich auch CCL20, wodurch weitere $T_{\text{H}}17$ -Zellen und T_{regs} mobilisiert werden (Yamazaki et al., 2008). Man geht davon aus, dass die Blockade von CCR6 als therapeutisches Mittel für verschiedene entzündliche und autoimmune Erkrankungen in Frage kommt (Ranasinghe und Eri, 2018).

1.1.4.2 Transkriptionsfaktoren

Als Mastertranskriptionsfaktor und Identifizierungsmarker der regulatorischen T-Zellen gilt FoxP3. Dieser wurde in Kapitel 1.1.3.2 ausführlich beschrieben.

ROR γ t ist ein nukleärer Hormonrezeptor, der eine Verwandtschaft zu den Melatonin-Rezeptoren ROR α und ROR β aufweist und einer circadianen Steuerung unterliegt (Eberl, 2017). Eine Störung der circadianen Rhythmik kann über den Transkriptionsfaktor Nfil3 und seine suppressive Wirkung auf ROR γ t zu einer T_H17-Dysregulation und daraus resultierender Immunanfälligkeit führen (Yu et al., 2013). Für T_H17-Zellen agiert ROR γ t als Haupttranskriptionsfaktor. Ein Knock-out führt zur Abschwächung von Autoimmunreaktionen und dem Fehlen von T_H17-Zellen (Ivanov et al., 2006). Für die vollständige Differenzierung der T_H17-Zellen wird neben ROR γ t auch ROR α benötigt. Natürliche Liganden von ROR γ t sind Metabolite des Cholesterins (Santori et al., 2015). Darüber hinaus konnten auch synthetische ROR γ t-Modulatoren hergestellt werden, mit entweder steigernder oder hemmender Wirkung, die sich in klinischer Testung befinden (Zhang et al., 2015, Gege, 2021).

Helios (IKZF2) gehört zur Familie der Ikaros Zinkfingerproteine. Diese können über vier N-terminale Zinkfinger Desoxyribonukleinsäure (DNA) binden und über zwei weitere C-terminale Zinkfinger Homo- und Heterodimere mit anderen Ikaros-Proteinen bilden (Cobb und Smale, 2005). Helios befindet sich im Zellkern von T-Lymphozyten und nimmt regulativen Einfluss auf die Transkription (Hahm et al., 1998). Thornton et al. (2010) zeigten, dass sowohl in der Maus als auch im Menschen circa 70% der FoxP3⁺ T_{regs} Helios exprimieren. Vor allem in der Maus deutet die Expression von Helios durch eine T_{reg} darauf hin, dass diese ursprünglich im Thymus (= tT_{reg}) entstanden ist (Shevach und Thornton, 2014). Unter bestimmten Voraussetzungen können Helios⁺ T_{regs} jedoch auch in der Peripherie entstehen (Pratama et al., 2020). Generell ist die Funktion von Helios bis heute in murinen T_{regs} eindeutiger aufgeklärt als in humanen (Lam et al., 2022). Für Erstere konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Helios⁺ T_{regs} eine höhere suppressive Aktivität ausüben, während Helios⁻ T_{regs} eine geringere FoxP3-Expression aufweisen und das vollständige Fehlen von Helios mit der Entwicklung von Autoimmunphänomenen einhergeht (Kim et al., 2015, Nakagawa et al., 2016). Studien humaner T_{regs} kamen bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Helios-Expression und regulatorischer Aktivität zu heterogenen Ergebnissen (Kim et al., 2012, Raffin et al., 2013).

1.1.4.3 Zytokine

Die für die regulatorische Wirkung der T_{regs} charakteristischen Zytokine sind IL-10, IL-35 und TGF β . Im Hinblick auf eventuelle Abweichungen hin zu einem alternativen Phänotyp wurde in dieser Arbeit die Ausschüttung der für ihre pro-inflammatorische Wirkung bekannten Zytokine TNF α , IFN γ und IL-17 untersucht.

Carswell et al. (1975) wiesen in murinem Serum ein Molekül nach, das Nekrose in Tumoren auslösen konnte und daraufhin Tumornekrosefaktor Alpha (TNF α) genannt wurde. Ehemals auch als *Cachectin* bezeichnet, wurde für TNF α ebenfalls eine Rolle bei der Auslösung von Kachexie, Schock und Inflammation gezeigt (Beutler und Cerami, 1988). Es wird hauptsächlich durch Zellen der Monozyten/Makrophagen-Linie ausgeschüttet, aber auch von zahlreichen anderen Zelltypen, insbesondere aktivierten T-Lymphozyten (Sung et al., 1988). Auch T_{regs} können dazu stimuliert werden, selbst TNF α zu produzieren, ohne dass sie dadurch zwangsläufig ihre suppressive Wirkung verlieren (Walter et al., 2013). Man unterscheidet membranständiges TNF α (mTNF, 26kDa) von löslichem TNF α (sTNF, 17 kDa) (Black et al., 1997). Auch gibt es zwei Rezeptoren (TNFR) – TNFR 1 und 2. Während TNFR1 ubiquitär exprimiert wird und sowohl mTNF als auch sTNF bindet, findet sich TNFR2 auf Immunzellen und besitzt eine höhere Affinität zu mTNF als zu sTNF (Grell et al., 1995, Chen et al., 2013). Über die Rezeptoren kann TNF α einerseits Apoptose induzieren, andererseits anti-apoptotisch wirken (Postal und Appenzeller, 2011). Es kann Zelldifferenzierung und -proliferation vermitteln und eine überschießende TNF α -Wirkung wurde mit chronischen Entzündungen und pathologischer Autoimmunität in Verbindung gebracht (Jang et al., 2021). Bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen konnte eine vermehrte Produktion von TNF α nachgewiesen werden und für einzelne Entitäten wie beispielsweise chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) und rheumatoide Arthritis werden TNF α -Blocker erfolgreich therapeutisch eingesetzt (Melsheimer et al., 2019).

Ein weiteres Zytokin, das für inflammatorische Prozesse eine Rolle spielt, ist IFN γ . Interferone wurden erstmals im Zusammenhang mit ihrer antiviralen Wirkung entdeckt (Isaacs et al., 1957). Man unterscheidet drei Gruppen, die sich durch verschiedene Rezeptoren und ihre Lokalisation auf unterschiedlichen Genloci unterscheiden: Typ 1 mit den Vertretern IFN α , β , κ , ϵ und ω , Typ 2 – IFN γ –, und Typ 3 – IFN λ 1-3 (Sheppard et al., 2003, Kotenko et al., 2003, Capobianchi et al., 2015). Ursprünglich wurde IFN γ als Makrophagen-Aktivierungsfaktor beschrieben und man ging davon aus, dass hauptsächlich $T_{\text{H}}1$ - und cytotoxische Lymphozyten IFN γ ausschütten. Man konnte aber

auch zeigen, dass weitere Zellen wie B-Zellen, natürliche Killerzellen und antigenpräsentierende Zellen $\text{IFN}\gamma$ produzieren (Schroder et al., 2004). Darüber hinaus kann es ebenfalls von T_{regs} ausgeschüttet werden, charakteristisch bleibt es jedoch für die $T_{\text{H}}1$ -vermittelte Immunabwehr (Walter et al., 2013). Die $\text{IFN}\gamma$ -Produktion von T-Zellen wird dabei durch die gemeinsame Wirkung von IL-12 und IL-18 gesteigert (Munder et al., 1998). Zu den Zytokinen mit negativer regulativer Wirkung auf die $\text{IFN}\gamma$ -Ausschüttung zählen hingegen IL-4 und IL-10 (Schindler et al., 2001, Fukao et al., 2001).

Analog zu $T_{\text{H}}1$ -Reaktionen, die vorrangig mit $\text{IFN}\gamma$ in Verbindung gebracht werden, ist Interleukin-17 (IL-17) das kennzeichnende Zytokin von $T_{\text{H}}17$ -Reaktionen. Die IL-17-Familie umfasst sechs derzeit bekannte Vertreter: IL-17A-F (Kolls und Lindén, 2004). Das mit IL-17 im engeren Sinne adressierte Zytokin entspricht dem Subtyp IL-17A und ist im Folgenden mit IL-17 gemeint. Hauptsächlich wird IL-17 von $T_{\text{H}}17$ Zellen ausgeschüttet, in geringerem Umfang, auch von T_{regs} . Eine wichtige Rolle für die IL-17-Expression scheint IL-23 zu spielen, das die $T_{\text{H}}17$ -Differenzierung stimuliert. Das von IL-17 über seinen spezifischen IL-17-Rezeptor ausgelöste Signal gilt als eher schwach, in der Kombination mit anderen Zytokinen können jedoch potente Effekte vermittelt werden (Li et al., 2019, McGeachy et al., 2019). Dass *in vivo* nicht lediglich ein einzelnes Zytokin ausschlaggebend für einen inflammatorischen Prozess ist, sondern vielmehr verschiedene Zytokine auf einen pro-inflammatorischen Stimulus hin ausgeschüttet werden, die dann zu einer Immunantwort beitragen, spiegelt sich in der Beobachtung wider, dass IL-17 eine synergistische Aktivität unter anderem mit den zuvor beschriebenen Zytokinen $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ zeigt (Onishi und Gaffen, 2010). Über positive und negative Feedbackmechanismen kann physiologisch eine Selbstregulation der IL-17-Ausschüttung erfolgen. Da für verschiedene Immunpathologien eine überschießende IL-17-Wirkung vermutet wird, wurden Antikörper gegen das Zytokin und seinen Rezeptor entwickelt, die bei einzelnen Autoimmunerkrankungen sehr gute therapeutische Wirkung zeigten (McGeachy et al., 2019).

1.1.5 Autoimmunität

Pathologien des Immunsystems lassen sich in zwei Hauptbereiche unterteilen: auf der einen Seite Immundefizienz im Sinne einer unzureichenden Fähigkeit des Organismus, eine effektive Immunantwort hervorzubringen; auf der anderen Seite Autoimmunität als Ausdruck verminderter Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen und daraus resultierend eine Immunantwort gegen den Organismus selbst. Zu den am weitesten verbreiteten Autoimmunerkrankungen zählen der Typ-1-Diabetes und die autoimmunen

Schilddrüsenerkrankungen, insbesondere die Hashimoto Thyreoiditis. Daneben gibt es nahezu 100 weitere beschriebene Autoimmunerkrankungen mit niedrigerer Prävalenz, die zum Teil generalisiert auftreten wie im Falle des systemischen Lupus erythematodes (SLE) oder aber sich Organ-spezifisch manifestieren wie die AIH (Wang et al., 2015).

Durch das Zusammenspiel der bereits vorgestellten Toleranzmechanismen gelingt es dem gesunden Organismus, Autoimmunerkrankungen zu vermeiden. Ein gewisses Maß an Autoimmunität ist für die Aufrechterhaltung immunologischer Regulationsvorgänge sogar notwendig und physiologisch. Die pathologische Autoimmunität als Ausdruck einer Störung des Gleichgewichts zwischen Inflammation und Regulation entsteht nicht zwangsläufig aus dem Wegfall eines einzigen Toleranzmechanismus, vielmehr liegt der Manifestation nach aktuellem Verständnis meistens ein Versagen mehrerer Kontrollpunkte zugrunde (Marrack et al., 2001).

Im Allgemeinen wurde für verschiedene Lymphozyten-Populationen eine Bedeutung für Autoimmunerkrankungen gezeigt. Sowohl B-Zell- als auch T-Zell-Defekte können zu einer pathologischen Aktivität führen (Del Prete, 1992, Parkes et al., 2013). Einige Autoimmunerkrankungen zeigen eine familiäre Häufung und legen daher das Vorhandensein genetischer Prädispositionen nahe. Auch gewisse Umwelteinflüsse scheinen das Auftreten von Autoimmunpathologien zu begünstigen (Rai und Wakeland, 2011). Dazu könnten Nahrungsantigene, aber auch das Vorkommen von Erregern, wie manche Viren oder Bakterien beitragen, die potenziell als Trigger-Faktoren wirken und die Immunhomöostase stören (von Herrath und Oldstone, 1996, Anaya et al., 2018). Man vermutet, dass die strukturelle Ähnlichkeit der Erregerproteine zu körpereigenen Proteinen dabei eine Rolle spielt. Nach Erregerbeseitigung werden die aktivierten Immunzellen von den ähnlichen und weiterhin vorhandenen körpereigenen Strukturen zur Fortführung der inflammatorischen Aktivität angehalten. Wenn die Kapazität der regulatorischen Komponenten dabei überschritten ist, kann es zu Gewebsschädigung und damit zur klinischen Manifestation der Erkrankung kommen (Rojas et al., 2018). Funktionieren die Regulationsmechanismen selbst nicht einwandfrei, kann das Immunsystem entsprechend leichter aus dem Gleichgewicht gebracht werden. Für viele Autoimmunerkrankungen konnten außerdem Autoantikörper identifiziert werden, deren Nachweis meist diagnostischen Wert hat (Manns, 1989, Kotzin, 1996, Yu et al., 1996, Terziroli Beretta-Piccoli et al., 2022).

1.1.6 Inflammation und Regulation in der Leber

Die Leber liegt als unpaariges Organ im rechten Oberbauch und erhält über die Portalvene das Metaboliten-reiche Blut der Verdauungsorgane. Im hepatischen Gewebe finden Austausch- und Abbauprozesse statt, durch die schädliche Substanzen aus dem Kreislauf eliminiert werden können. Dabei kommt die Leber mit einer Vielzahl von Antigenen etwa aus der Nahrung oder dem Mikrobiom in Berührung und muss zwischen pathogenen und harmlosen Strukturen unterscheiden können. Spezialisierte Zellen wie die Sinusendothelzellen (LSECs) und organspezifische Makrophagen – so genannte Kupffer-Zellen (KCs) – schaffen in der gesunden Leber ein überwiegend tolerantes Milieu. Erzielt wird dies unter anderem durch die Induktion regulatorischer T-Zellen (Carambia et al., 2014). Trotzdem kann es wie in anderen Geweben zur Aufhebung der Toleranz und konsekutiv zur Inflammation kommen, wenn pro-inflammatorische Stimuli überwiegen und nicht oder nicht ausreichend kontrolliert werden (Heymann et al., 2015). Dauerhaft kann dies mit einer Schädigung des Leberparenchyms einhergehen, die sich in der Regel von einer potenziell reversiblen Fibrosierung über die Entwicklung einer Zirrhose bis hin zum Leberversagen vollzieht (Robinson et al., 2016).

1.2 Autoimmune Lebererkrankungen

Den Hauptuntersuchungsgegenstand dieser Arbeit stellt die AIH dar, die im Folgenden näher beschrieben wird. Daneben gibt es mit der primär sklerosierenden Cholangitis (PSC) und der primär biliären Cholangitis (PBC) zwei weitere autoimmune Lebererkrankungen, die als Vergleichskohorten rekrutiert wurden und an dieser Stelle ebenfalls erläutert werden sollen.

1.2.1 Autoimmunhepatitis

Bei der Autoimmunhepatitis handelt es sich um eine seltene chronisch-entzündliche Lebererkrankung bisher nicht vollständig aufgeklärter Ursache. Die Prävalenz der AIH wurde für Deutschland 2014 mit 23 pro 100 000 Einwohner angegeben und ist tendenziell steigend (Sebode et al., 2020).

In Europa liegt der Anteil weiblicher Patienten an der Gesamtpatientengruppe zwischen 72 und 80 Prozent. Frauen haben demnach ein bis zu vierfach höheres Risiko an einer AIH zu erkranken als Männer (Czaja, 2017).

Die AIH kann in jedem Alter auftreten, es zeichnen sich jedoch zwei Altersgipfel ab, zum einen bei Kindern und Jugendlichen und zum anderen bei den 40- bis 60-Jährigen (EASL, 2015). Die juvenile AIH ähnelt in vielen Aspekten der adulten Form, tritt aber oft

aggressiver in Erscheinung (Sokollik et al., 2018, Mieli-Vergani et al., 2018a). Diese Arbeit konzentriert sich auf die adulte AIH.

1.2.1.1 Ätiopathogenese

Zurückzuführen ist die AIH auf eine gegen die Leber gerichtete inadäquate Immunantwort. Insbesondere Zellen der adaptiven Immunabwehr sind daran beteiligt. Autoreaktive T-Zellen erkennen Leber-eigene Antigene, die von APCs präsentiert werden (Czaja und Manns, 2010, Hardtke-Wolenski et al., 2013). Die Tatsache, dass es dabei zu einer anhaltenden Reaktion inklusive Organschädigung kommt, die der Körper nicht selbst limitieren kann, ist lediglich durch ein Zusammenkommen mehrerer Faktoren zu erklären und bisher nicht hinreichend verstanden. Die Autoimmunität kann potenziell in einer Dysfunktion jeder der an der Immunreaktion beteiligten Komponenten begründet liegen und die vermuteten Pathomechanismen berücksichtigen genetische Prädispositionen, extrinsische Einflüsse sowie eine Dysregulation auf zellulärer und humoraler Ebene (Herkel et al., 2020).

Neben dem weiblichen Geschlecht als Risikofaktor und einem Zusammenhang mit dem Auftreten weiterer Autoimmunerkrankungen konnten mithilfe genomweiter Assoziationsstudien verschiedene Genvarianten und Polymorphismen als prädisponierend beziehungsweise protektiv identifiziert werden. Das Vorliegen einer potenziell relevanten Mutation allein führt jedoch nicht zwangsläufig zum Ausbrechen einer AIH. Viel wahrscheinlicher beeinflusst die Interaktion verschiedener Polymorphismen das Auftreten und den Verlauf der Erkrankung (Heneghan et al., 2013).

Auch das Vorhandensein Leber-spezifischer Autoantikörper kennzeichnet die AIH (Sebode et al., 2018). Neben ihrem wahrscheinlichen Beitrag zur Pathogenese, spielen sie insbesondere bei der Diagnostik der AIH eine Rolle und werden im entsprechenden Kapitel näher benannt (siehe Kapitel 1.2.1.3).

Neben Autoantigenen, autoreaktiven Antikörpern und extrinsischen Faktoren wird bei der AIH eine Beteiligung regulatorischer T-Zellen an der Pathogenese kontrovers diskutiert. Es ist denkbar, dass eine generalisierte Dysfunktion der T_{regs} vorliegt oder aber ihre Funktion speziell im hepatischen Gewebe beeinträchtigt ist (Ferri et al., 2010, Chen et al., 2016). Daneben gibt es Untersuchungen, die keinen Anhalt für eine quantitative oder qualitative Funktionseinschränkung der T_{regs} finden konnten (Peiseler et al., 2012).

Der Auslöser für die Manifestation einer AIH könnte zudem in extrinsischen Faktoren begründet liegen. Eine Sensibilisierung des Organismus durch extrinsische Faktoren kann mehrmals und über einen längeren Zeitraum erfolgen, so dass eine Zuordnung zum

auslösenden Faktor in den wenigsten Fällen gelingt (Heneghan et al., 2013). In Frage kommen beispielsweise virale Trigger, Medikamente oder deren Metabolite sowie Mikrobiom-Veränderungen (Sebode et al., 2017, Mieli-Vergani et al., 2018b, Wei et al., 2020). Es ist möglich, dass diese Stimuli die Schädigung der Hepatozyten unter bestimmten Voraussetzungen auslösen und über co-inflammatorische Signale eine Auto-Inflammation vorantreiben (Herkel et al., 2020).

1.2.1.2 Klinik

Klinisch können sich Patient:innen mit AIH sehr unterschiedlich präsentieren. Das Spektrum reicht von subklinischen Verläufen, die als Zufallsbefund auffallen, bis hin zu akutem Leberversagen (Feld et al., 2005).

Mögliche – jedoch sehr unspezifische – Symptome sind Gewichtsverlust, Müdigkeit, Abgeschlagenheit und Gelenkschmerzen. In der klinischen Untersuchung kann zudem ein Ikterus auffallen (Heneghan et al., 2013). Außerdem besteht häufig eine Assoziation mit extrahepatischen weiteren Autoimmunerkrankungen, allen voran die Hashimoto Thyreoiditis, aber auch rheumatoide Arthritis, Vaskulitiden oder chronisch-entzündliche Darmerkrankungen können auftreten und zum Symptomkomplex beitragen (Teufel et al., 2010).

1.2.1.3 Diagnostik und Klassifikation

Die Diagnose AIH ist in der Regel eine Ausschlussdiagnose. Differentialdiagnostisch kommt eine Vielzahl anderer immunologischer- und nicht-immunologischer Erkrankungen in Frage wie beispielsweise virale Hepatitiden, die alkoholische Lebererkrankung, Morbus Wilson oder Zöliakie (Gatselis et al., 2015).

Patienten fallen häufig durch erhöhte laborchemische Leberwerte auf. Die Leberenzyme Aspartat-Aminotransferase (ASAT) und Alanin-Aminotransferase (ALAT) befinden sich im Innern der Hepatozyten und werden bei Leberzellschädigung vermehrt im Blut messbar. Für eine AIH ebenfalls kennzeichnend ist ein erhöhter Immunglobulin G (IgG) Spiegel (Alvarez et al., 1999). Es werden aber auch akute Fälle ohne IgG-Erhöhung beschrieben (Mieli-Vergani et al., 2018b, Terziroli Beretta-Piccoli et al., 2022).

Für die klinische Anwendung hat die *International Autoimmune Hepatitis Group* (IAIHG) diagnostische Kriterien veröffentlicht. Es handelt sich dabei um ein Punktesystem, das sich auf das Vorhandensein von Autoantikörpern, die Erhöhung von IgG, das histologische Erscheinungsbild und den Ausschluss einer viralen Hepatitis

stützt (vgl. Tab. 1). Ein Punktwert von ≥ 6 spricht für eine wahrscheinliche AIH, ≥ 7 Punkte für eine definitive AIH (Hennes et al., 2008).

Tabelle 1: Diagnostische Kriterien der International Autoimmune Hepatitis Group.
(Hennes et al., 2008)

Kriterium	Grenzwert	Punkte
ANA oder SMA	$\geq 1:40$	1*
	$\geq 1:80$	2*
Oder LKM	$\geq 1:40$	2*
Oder SLA	Positiv	2*
IgG	> oberes Limit des Normbereichs	1
	> 1,1-faches des oberen Limits	2
Leberhistologie (Evidenz einer Hepatitis vorausgesetzt)	Vereinbar mit einer AIH	1
	Typisch für eine AIH	2
Ausschluss viraler Hepatitis	Ja	2

*Summe der Punkte für alle Autoantikörper maximal 2

Autoantikörper können in mehr als 90% der Fälle nachgewiesen werden, haben jedoch eine relativ niedrige Spezifität (Bogdanos et al., 2009). Die Differenzierung der Autoantikörper ermöglicht eine Unterteilung der AIH in zwei bekannte Subtypen: Typ 1 – gekennzeichnet durch antinukleäre (ANA) oder anti-smooth-muscle Antikörper (SMA) sowie gegebenenfalls auch anti-soluble-liver-antigen (SLA) Antikörper – und der weitaus weniger verbreitete Typ 2 – charakterisiert durch anti-liver-kidney-microsome (LMK) Antikörper und in der Regel mit einem früheren Manifestationszeitpunkt und aggressiverem Verlauf (Homborg et al., 1987, Floreani et al., 2013).

Ein weiterer diagnostischer Pfeiler ist die histologische Untersuchung des Lebergewebes nach Biopsie. Mikroskopisch zu erwarten ist das Bild einer *Interface Hepatitis*, das charakteristisch, aber nicht spezifisch für eine AIH ist. Dabei findet sich ein von Lymphozyten und Plasmazellen geprägtes Infiltrat, das vom Portaltrakt bis ins umliegende Parenchym reicht (Gatselis et al., 2015).

1.2.1.4 Therapiekonzept

Mithilfe einer medikamentösen Therapie soll zum einen die biochemische Remission erzielt werden, zum anderen sollen Symptome beseitigt oder gemildert werden. Die komplette biochemische Remission ist definiert durch die Normalisierung der Serum-Transaminasen und des IgG-Spiegels und sollte innerhalb von 6 Monaten nach

Therapiebeginn erzielt werden (Pape et al., 2022). Liegt bereits eine Zirrhose vor, kann eine Remission jedoch auch mit einem weiterhin über der Norm liegenden IgG einhergehen (Mack et al., 2020). Mit der biochemischen Remission wird in der Regel auch eine Normalisierung der inflammatorischen Aktivität in der Histologie und die Reduktion der Leberschädigung erzielt (Lüth et al., 2008).

Die Standardtherapie sieht den Einsatz des Kortikosteroids Prednisolon und des Zytostatikums Azathioprin vor (Strassburg et al., 2017). Alternativ kann statt Prednisolon auch Budesonid eingesetzt werden (Manns et al., 2010). Die Wirkung beider Substanzen ist auf eine unspezifische Hemmung des Immunsystems zurückzuführen, durch die die Autoinflammation aber auch die allgemeine Immunabwehr geschwächt werden. Neben Infektionen mit potenziell schwerem Verlauf kann der erzeugte Hyperkortisolismus zahlreiche weitere systemische Nebenwirkungen hervorrufen (Rice et al., 2017). Man versucht daher, die Steroide nach Erreichen einer Remission möglichst vollständig auszuschleichen, wohingegen die Weitereinnahme von Azathioprin zur Erhaltungstherapie empfohlen wird (Strassburg et al., 2017).

Bei Azathioprin-Unverträglichkeit oder ausbleibendem Therapierfolg stehen als konventionelle Alternativen 6-Mercaptopurin und Mycophenolat Mofetil zur Verfügung (EASL, 2015, Hübener et al., 2016). Für die 10-20% schwer zu therapierenden AIH-Patient:innen, die auf die Standardtherapie nicht ausreichend ansprechen, wurden Antikörpertherapien, etwa gegen TNF α getestet (Weiler-Normann et al., 2013).

1.2.2 Primär sklerosierende Cholangitis und primär biliäre Cholangitis

Die PSC und die PBC, dienten im experimentellen Teil der Arbeit neben gesunden Proband:innen als Kontrollgruppen. Im Folgenden soll ein kurzer vergleichender Überblick über die beiden Erkrankungen gegeben werden.

Von der PBC sind wie bei der AIH vor allem Frauen betroffen. Bei der PSC ist das Geschlechterverhältnis ausgeglichener. Während die PBC klassischerweise bei Kindern nicht beobachtet wird und sich vor allem zwischen 40 und 70 manifestiert, kann die PSC in jedem Alter auftreten. Häufig sind Männer mittleren Alters betroffen (Pannicke et al., 2012).

Die Pathogenese ist ähnlich wie bei der AIH nicht abschließend geklärt und es konnten für beide Entitäten sowohl genetische Faktoren als auch Umweltfaktoren identifiziert werden. Die PSC ist häufig mit dem Vorliegen einer Colitis ulcerosa assoziiert und man geht davon aus, dass der entzündlichen Fibrosierung und Vernarbung der Gallenwege

pathophysiologisch eine T-Zell-Aktivierung mit Ausschüttung fibrogener Substanzen zugrunde liegt (Dyson et al., 2018). Bei der PBC exprimiert das Gallengangsepithel Epitope, die von T-Zellen gebunden und als pathogen wahrgenommen werden. Außerdem konnten lokal vermehrt NK-T-Zellen nachgewiesen werden, die pro-inflammatorische Zytokine ausschütten (Carey et al., 2015).

Neben den unspezifischen Symptomen, die bei allen autoimmunen Lebererkrankungen auftreten können, tritt bei der PSC und PBC häufig auch Juckreiz (Pruritus) als Folge eines Aufstaus der Galle (Cholestase) auf. Davon abgesehen, präsentiert sich ein Großteil der Patienten klinisch zunächst asymptomatisch (Lindor et al., 2009, Karlsen et al., 2017).

Die Diagnose der PBC stützt sich auf den laborchemischen Nachweis einer Cholestase – gekennzeichnet durch die Erhöhung der alkalischen Phosphatase (AP) und γ -Glutamyltransferase (γ GT) – sowie spezifischer Autoantikörper und erhöhter Leberenzyme. Typischerweise ist anders als bei der AIH zusätzlich nicht IgG, sondern IgM erhöht (Younossi et al., 2019). Bei der PSC sind ebenfalls die laborchemisch festzustellende Cholestase, das Vorliegen charakteristischer Antikörper und eine passende Histologie diagnostisch hilfreich (Lazaridis und LaRusso, 2016).

Die Transplantation stellt bei der PBC und PSC die einzige kurative Therapie dar. Für die PBC gibt es mit dem Gallensäuren-Substitut Ursodesoxycholsäure (UDCA) eine medikamentöse Leitlinientherapie, die das Fortschreiten der Erkrankung verlangsamt und damit das transplantatfreie Überleben verlängert (Strassburg et al., 2017). Immunsuppressive Therapiestrategien konnten sich bisher nicht etablieren (Shah und Kowdley, 2020).

Zeigen Patient:innen Charakteristika sowohl einer AIH als auch einer PSC oder PBC, so spricht man in diesen Fällen von Overlap-Syndromen, deren Prävalenz auf 10-20% der PSC- und PBC-Fälle geschätzt wird (Schramm und Lohse, 2005).

1.3 Zielsetzung der Dissertation

Die AIH ist eine seltene autoimmune Lebererkrankung, bei der der Organismus eine fehlgeleitete Immunreaktion gegen das eigene Gewebe zeigt. Aufgrund der unzureichend geklärten Ätiologie und oftmals schwierigen Abgrenzbarkeit zu anderen Erkrankungen der Leber gestaltet sich die Diagnosestellung und Therapie häufig langwierig. Die Behandlung baut in der Regel auf einer meist ungerichteten Immunsuppression auf. Dementsprechend besteht weiterer Forschungsbedarf hinsichtlich der auf zellulärer Ebene stattfindenden Prozesse sowie der Charakterisierung beteiligter Akteure des Immunsystems.

Regulatorische T-Zellen spielen wie dargelegt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts zwischen immunologischer Abwehr und Toleranz. Störungen der T_{reg}-Funktion wurden mit dem Auftreten von Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht und werden als Auslöser oder prädisponierender Faktor für die AIH kontrovers diskutiert. Es wird davon ausgegangen, dass eine T_{reg} innerhalb ihrer Lebensspanne durch Stimuli beeinflusst und damit phänotypisch beziehungsweise funktionell verändert werden kann – also Plastizität aufweist.

Diese Dissertation beschäftigt sich mit der Plastizität regulatorischer T-Zellen bei Autoimmunhepatitis vor dem Hintergrund einer möglichen Beteiligung dieser an der Krankheitsentstehung oder -progression. Ziel der Arbeit ist, die potenziell veränderte Ausprägung der für die T_{reg}-Funktion relevanten Strukturen, die in Kapitel 1.1.4 vorgestellt wurden, bei Patient:innen mit Autoimmunhepatitis im Vergleich zu einer gesunden Kohorte sowie PBC- und PSC-Erkrankten explorativ zu untersuchen. Dadurch sollen Rückschlüsse auf einen selektiven Funktionsverlust oder eine vermehrte Autoreaktivität der T_{regs} gezogen werden. Das Studiendesign sowie das experimentelle Vorgehen werden im folgenden Kapitel umfassend dargelegt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 2: Geräte

Gerät	Hersteller
CO ₂ Inkubator MCO-19AIC	SANYO Biomedical
Durchflusszytometer LSRFortessa™	BD Biosciences
Kühlschrank	Robert Bosch Hausgeräte GmbH
Mikrozentrifuge myFuge 12	Benchmark Scientific Inc.
Pipetten Research plus (10, 100, 1000 µl)	Eppendorf AG
Pipettierhilfe Pipetboy acu 2	INTEGRA Biosciences GmbH
Sicherheitswerkbank MSC-Advantage	Thermo Scientific GmbH
Vortexer Vortex-Genie 2	Scientific Industries SI
Zentrifuge 5417 R, 5810 R, 5920 R	Eppendorf AG

Tabelle 3: Verbrauchsutensilien

Material	Hersteller
MACS Pre-Separation Filter	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG
Pipettenspitzen (20, 200 und 1200 µl)	Sarstedt AG & Co
Pipettenspitzen Biosphere® mit Filter (20, 200 und 1200 µl)	Sarstedt AG & Co
Reagiergefäße (0,2, 1,5 und 2 ml)	Sarstedt AG & Co
S-Monovette Lithium-Heparin	Sarstedt AG & Co
Safety-Multifly®-Kanüle 21G, 200 mm	Sarstedt AG & Co
Serologische Pipetten (2, 5, 10, 25 und 50 ml)	Sarstedt AG & Co
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	Greiner Bio-One International GmbH

Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien

Material	Hersteller
Amphotericin B aus Streptomyces sp.	Sigma-Aldrich Inc.
FACS Clean Lösung	BD Biosciences
FACS Flow Lösung	BD Biosciences
FACS Rinse Lösung	BD Biosciences
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH
GolgiPlug™	BD Biosciences
Humanes AB-Serum	MP Biomedicals Germany GmbH
Ionomycin	Sigma-Aldrich
Isotonische Kochsalzlösung 0,9 %	B. Braun Medical AG
OneComp eBeads Compensation Beads	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific Inc.
Pacific Orange™ N-Hydroxysuccinimid Ester (PacO-NHS)	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific Inc.
Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml	Gibco®/Life Technologies
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich Inc.
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Zellkulturmedium	Gibco®/Life Technologies

Tabelle 5: Antikörper

Antikörper	Fluorochrom	Klon	Hersteller
Anti-human CD4	PE/Dazzle™ 594	RPA-T4	BioLegend
Anti-human CD25	Brilliant Violet 421™	BC96	BioLegend
Anti-human CD39	PE/Cyanine7	A1	BioLegend
Anti-human CD45	Brilliant Violet 785™	HI30	BioLegend
Anti-human CD127 (IL-7Rα)	Alexa Fluor® 647	A019D5	BioLegend
Anti-human CD152 (CTLA-4)	PE	L3D10	BioLegend
Anti-human CD196 (CCR6)	PerCP/Cyanine5.5	G034E3	BioLegend
Anti-human CD279 (PD-1)	PerCP/Cyanine5.5	A17188B	BioLegend
Anti-human FoxP3	Alexa Fluor® 488	259D	BioLegend
Anti-mouse/human Helios	PE	22F6	BioLegend
Anti-Human IL-17A	Brilliant Violet 711™	BL168	BD Biosciences
Anti-human IFN γ	PerCP/Cyanine5.5	B27	BioLegend
Anti-mouse/human ROR γ t	PE	AFKJS-9	eBioscience
Anti-human TNF α	Brilliant Violet 650™	MAb11	BioLegend

Tabelle 6: Kits

Kit	Hersteller
Human FoxP3 Buffer Set	BD Pharmingen

Tabelle 7: Software

Software	Hersteller
BD FACSDiva	BD Biosciences
EndNote	Alfasoft GmbH
FlowJo	FlowJo LLC
GraphPad Prism	GraphPad Software

2.2 Medien und Puffer

Tabelle 8: Zell-Kulturmedium

Bestandteil	Menge
RPMI 1640 Medium	500 ml
AB-Serum	25 ml
Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml	5 ml
Amphotericin B 1,25 mg/l	250 µl

Tabelle 9: Einfache phosphatgepufferte Salzlösung (1x PBS), pH 7,4

Bestandteil	Konzentration
Kaliumchlorid (KCl)	2,7 mM
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	6,5 mM
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	1,5 mM
Natriumchlorid (NaCl)	137 mM

2.3 Humanes Probenmaterial

Das untersuchte Probenmaterial der AIH- sowie PBC- und PSC-Kohorte stammt aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE). Die Mehrzahl der Patient:innen besucht die Sprechstunde für autoimmune Lebererkrankungen nach Erstvorstellung in der Regel wiederkehrend zur Kontrolle und Therapie-Re-Evaluation. Ein Großteil der eingeschlossenen Patient:innen befand sich zum Zeitpunkt der Probengewinnung bereits unter immunsuppressiver Therapie mit Kortikosteroiden (vgl. Tab. 10) oder Azathioprin, beziehungsweise vergleichbarer Zweitlinientherapie.

Die Hauptuntersuchungsgruppe bildeten Patient:innen mit AIH. Einschlusskriterium war die gesicherte Diagnose AIH nach den Diagnosekriterien der IAIHG (vgl. Kapitel 1.2.1.3). Bei den akuten schweren Fällen lag die gesicherte Diagnose zum Zeitpunkt der Probengewinnung teilweise noch nicht vor, bestätigte sich aber in allen Fällen nach Abschluss der Diagnostik, so dass kein:e Proband:in retrospektiv ausgeschlossen werden musste. Als Referenzgruppe dienten zum Vergleich Proben von Patient:innen mit der Diagnose PSC und PBC. Ausschlusskriterien waren eine erfolgte oder andauernde Antikörper-Therapie, sowie das Vorliegen weiterer aktiver Leber- oder Autoimmunerkrankungen, abgesehen von der sehr häufig vergesellschafteten Hashimoto-Thyreoiditis – die auch in der Allgemeinbevölkerung mit einer Prävalenz von circa 7,5% auftritt (Hu et al., 2022) – und bei der PSC das Vorliegen einer CED, die bei circa 70% der

PSC-Erkrankten auftritt (Weismüller et al., 2017). Ein bekanntes Overlap-Syndrom von zwei autoimmunen Lebererkrankungen zählte ebenfalls als Ausschlusskriterium.

Die Proben der gesunden Kontrollgruppe stammen von Proband:innen insbesondere aus der Mitarbeiterschaft des UKEs. Die Gruppen sollten sich in Geschlechterverteilung und Alter ähneln und Proband:innen wurden daher nach Möglichkeit dementsprechend rekrutiert.

Als Untersuchungsmaterial wurde pro Proband:in ein mit Lithium-Heparin versetztes Röhrchen Blut per venöser Blutentnahme gewonnen. Die Probenentnahme für die Liver.net Biobank wurde durch die Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt (PV4081) und die Proband:innen gaben vor der Entnahme ihre schriftliche Einwilligung zur Studienteilnahme.

Die Probengewinnung erfolgte über den Zeitraum von Juli 2020 bis März 2021. Tabelle 10 stellt die Charakteristika der einzelnen Gruppen nach Krankheitsbild dar. Die klinischen Daten und Laborparameter wurden aus der elektronischen Patientenakte erhoben.

Tabelle 10: Untersuchungsgruppen nach Krankheitsbildern.

Dargestellt sind die Anzahl der erhobenen Datensätze pro Gruppe (n) sowie das Geschlechterverhältnis innerhalb der Gruppen (w = weiblich, m = männlich), das durchschnittliche Alter (M = Mittelwert), die durchschnittlichen Serum-ALAT-Spiegel inklusive Streuung (min = Minimum, max = Maximum, n.e. = nicht erhoben) und die Anzahl der Patient:innen unter Steroidtherapie zum Zeitpunkt der Probengewinnung.

Gruppe	n	Geschlecht (w:m)	Alter M in Jahren	ALAT M (min-max) in U/l	Steroid- einnahme
AIH	24	19:5	45,7	156 (9-1613)	8
PBC	7	6:1	44,8	40 (14-114)	0
PSC	7	3:4	42,3	39 (14-71)	0
Gesund	20	15:5	35,5	n. e.	0

2.3.1 Differenzierung nach Krankheitsaktivität

Es zeigt sich, dass innerhalb der AIH-Gruppe die Krankheitsaktivität stark variierte. Dies lässt sich insbesondere aus der Höhe der Transaminasen ableiten, die bekanntermaßen einen Surrogatparameter für das Ausmaß der Leberzellschädigung darstellen, sowie an der Höhe des Gesamt-IgGs, das in die Diagnosestellung mit eingeht. Es wurden daher Subgruppen gebildet mit Unterscheidung in vollständige laborchemische Remission und aktive Erkrankung.

Innerhalb der aktiv Erkrankten zeigte die Hälfte der Patient:innen eine Erhöhung der Leberenzyme auf mehr als das Dreifache der oberen Norm (ALAT > 150 U/l für männliche und > 105 U/l für weibliche Erkrankte), sowie eine deutliche Erhöhung des Gesamt-IgGs. Lediglich in einem Fall zeigte sich bei massiv erhöhten Leberenzymen ein normwertiges IgG. Diese Konstellation kann in einem akuten Krankheitsgeschehen bekanntermaßen vorliegen. Bei den Patient:innen die hier als schwere aktive Fälle beziehungsweise Fälle mit hoher laborchemischer Aktivität gewertet wurden, handelte es sich um Fälle akuter Erkrankung, bei denen die Krankheit zum Zeitpunkt der Probenentnahme gerade erst diagnostiziert wurde, die auf die eingeleitete Therapie ein refraktäres Ansprechen zeigten oder die nach initialer Remission und Absetzen der Medikation einen Rückfall erlitten. Tabelle 11 gibt einen Überblick über die Unterteilung hinsichtlich der Krankheitsaktivität und die jeweiligen Charakteristika der entsprechend gebildeten Gruppen.

Tabelle 11: Einteilung der AIH-Kohorte nach Krankheitsaktivität.

Unterscheidung in Proband:innen, die sich in Remission befanden und solche mit aktiver Erkrankung. Die letztere Gruppe wurde weiter unterteilt in moderate und schwere Aktivität in Abhängigkeit der Laborparameter. Dargestellt sind die Anzahl der erhobenen Datensätze pro Gruppe (n) sowie das Geschlechterverhältnis innerhalb der Gruppen (w = weiblich, m = männlich), das durchschnittliche Alter (M = Mittelwert), die durchschnittlichen Serum-ALAT-Spiegel inklusive Streuung (min = Minimum, max = Maximum) und die Anzahl der Patient:innen unter Steroidtherapie zum Zeitpunkt der Probengewinnung.

AIH	n	Geschlecht (w:m)	Alter M in Jahren	ALAT M (min-max) in U/l	Steroid- einnahme
Remission	12	9:3	45,9	16 (9-27)	1
Aktive Erkrankung	12	10:2	45,5	296 (43-1613)	7
<i>Schwer</i>	6	5:1	57,9	535 (119-1613)	3
<i>Moderat</i>	6	5:1	33,2	58 (43-73)	4

Um einen genaueren Eindruck von den eingeschlossenen Fällen zu bekommen, ist in Tabelle 12 die jeweilige Laborkonstellation aus ASAT-, ALAT- und IgG-Werten aufgezeigt.

Tabelle 12: Übersicht aktiver AIH-Fälle.

Unterteilung in moderate und schwere Krankheitsaktivität sowie die Übersicht über laborchemische Parameter zum Zeitpunkt der Testung, Geschlechtsangabe und ob eine Steroideinnahme erfolgt war. Zugrunde gelegte Normwerte: ALAT/ASAT < 35 für Frauen (w = weiblich), < 50 für Männer (m = männlich), IgG 6,50–16,00 g/l.

Aktive AIH	ASAT in U/l	ALAT in U/l	IgG in g/l	Geschlecht m/w	Steroide Ja/Nein
Schwer	663	462	24,6	w	Ja
	244	225	30,4	w	Ja
	147	119	23,9	w	Nein
	848	1613	14,8	w	Nein
	114	162	17,7	m	Nein
	510	628	23,5	w	Ja
Moderat	39	59	14,1	w	Ja
	32	54	12,0	w	Ja
	22	43	11,5	w	Nein
	39	49	16,0	w	Ja
	30	69	13,4	m	Nein
	59	73	16,7	w	Ja

2.3.2 Differenzierung nach Immunsuppression

Um den Einfluss der Medikamenteneinnahme auf die T_{regs} zu untersuchen, wurde die Gruppe der 24 eingeschlossenen AIH-Fälle zusätzlich unterteilt in diejenigen, die zum Zeitpunkt der Untersuchung eine immunsupprimierende Pharmakotherapie erhielten und diejenigen ohne entsprechende Medikation. Unter den eingeschlossenen Patient:innen nahmen sechs zum Zeitpunkt der Probenentnahme keine immunsuppressive Medikation ein, wohingegen die übrigen 18 Patient:innen eines der folgenden Medikamente oder deren Kombination erhielten: Prednisolon, Budesonid, Azathioprin, 6-Mercaptopurin und Tacrolimus.

In der Gruppe der medikamentös Behandelten war die Krankheitsaktivität mit einem durchschnittlichen ALAT von 99,2 Einheiten pro Liter (U/l) deutlich geringer (vgl. Tab. 13).

Tabelle 13: Gruppencharakteristika unterschieden nach Einnahme immunsupprimierender Medikation.
 Dargestellt ist die Anzahl der erhobenen Datensätze pro Gruppe (n) sowie das Geschlechterverhältnis innerhalb der Gruppen (w = weiblich, m = männlich), das durchschnittliche Alter (M = Mittelwert) und das durchschnittliche Serum-ALAT inklusive Streuung (min = Minimum, max = Maximum).

Immunsuppression	n	Geschlecht (w:m)	Alter M in Jahren	ALAT M (min-max) in U/l
Ja	18	14:4	47,0	99,2 (9-628)
Nein	6	5:1	41,8	327,5 (13-1613)

Eine Betrachtung der einzelnen Fälle zeigte, dass sich die Gruppe der Patient:innen ohne immunsupprimierende Medikation in drei Fälle mit nahezu vollständiger laborchemischer Remission und drei Fälle mit Zeichen akuter Leberschädigung teilt (vgl. Tab. 14). Erstere nahmen aufgrund der bestehenden Remission keine entsprechenden Medikamente mehr ein, wohingegen letztere bei Erstdiagnose der Erkrankung noch keine Medikation erhalten hatten, beziehungsweise ein Fall nach Remission ein Rezidiv erlitt.

Tabelle 14: Übersicht AIH-Fälle ohne Einnahme einer immunsupprimierenden Medikation.

Übersicht über laborchemische Parameter zum Zeitpunkt der Testung und Geschlechtsangabe. Zugrunde gelegte Normwerte: ALAT/ASAT < 35 für Frauen (w = weiblich), < 50 für Männer (m = männlich), IgG 6,50–16,00 g/l.

Keine Immunsuppression	ASAT in U/l	ALAT in U/l	IgG in g/l	Geschlecht m/w
	848	1613	14,8	w
	114	162	17,7	m
	147	119	23,9	w
	22	43	11,5	w
	16	15	10,64	w
	17	13	15,15	w

2.3.3 Differenzierung nach Steroideinnahme

Zusätzlich erfolgte eine Differenzierung hinsichtlich der Steroideinnahme. Von den 24 rekrutierten AIH-Patient:innen nahmen acht Prednisolon oder Budesonid allein oder in Kombination mit weiterer Medikation ein, wohingegen 16 keine Pharmakotherapie erhielten oder ausschließlich mit Azathioprin, dessen Metabolit 6-Mercaptopurin oder Tacrolimus behandelt wurden. Hinsichtlich des Alters zeigten beide Gruppen einen identischen Mittelwert (*M*), die entzündliche Aktivität lag in der Gruppe der Steroideinnehmenden mit einem ALAT von 196,3 U/l hingegen durchschnittlich höher als in der Vergleichsgruppe, bei der der Mittelwert bei 136,3 U/l lag (vgl. Tab. 15).

Tabelle 15: Gruppencharakteristika unterschieden nach Steroideinnahme.

Dargestellt ist die Anzahl der erhobenen Datensätze pro Gruppe (*n*) sowie das Geschlechterverhältnis innerhalb der Gruppe (w = weiblich, m = männlich), das durchschnittliche Alter (*M* = Mittelwert) und das durchschnittliche Serum-ALAT inklusive Streuung (min = Minimum, max = Maximum).

Steroideinnahme	n	Geschlecht (w:m)	Alter <i>M</i> in Jahren	ALAT <i>M</i> (min-max) in U/l
Ja	8	8:0	45,7	196,3 (20-628)
Nein	16	11:5	45,7	136,3 (9-1613)

2.4 Methoden

2.4.1 Studienkonzept

Die Vollblutproben der eingeschlossenen AIH-Patient:innen wurden analog zu den Proben der Vergleichsgruppen PSC, PBC und den Gesundkontrollen stimuliert und anschließend mit Antikörpern angefärbt, um die enthaltenen T_{regs} per Durchflusszytometrie zu identifizieren sowie das Vorhandensein verschiedener molekularer Strukturen quantitativ darzustellen. Im Anschluss daran erfolgte ein statistischer Vergleich, ob sich die T_{regs} bei der AIH bezüglich der Ausprägung der untersuchten Marker von den anderen Gruppen unterscheiden.

2.4.2 Stimulation

Die Blutproben wurden nach Gewinnung über Nacht bei 4° C in den Entnahmeröhrchen stehend gelagert und am Folgetag weiterverarbeitet.

Für eine vermehrte Aktivierung der T-Zellen wurden die Vollblutproben mit Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) und Ionomycin stimuliert. PMA/Ionomycin ist ein unspezifischer Reiz für die Zelle, der den T-Zell-Rezeptor umgeht. Durch den Zusatz von Brefeldin A (GolgiPlug™) akkumulieren die durch die Stimulation generierten Zytokine und Proteine in der Zelle. Brefeldin A stößt dabei den Rücktransport innerhalb der Zelle vom Golgi-Apparat zum endoplasmatischen Retikulum an. Dort verbleiben die Moleküle und lassen sich später anfärben und durchflusszytometrisch erfassen.

Pro 200 µl Vollblut wurden 200 µl eines in RPMI-basiertem Medium angesetzten Stimulationsmix (vgl. Tab. 16) verwendet. Die Proben wurden dann bei 37° C und 5% CO₂-Gehalt für vier Stunden inkubiert. Danach wurde die Stimulation durch die Zugabe von 1 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) abgeschwächt und die Probe *gewaschen*. Ein Waschvorgang entspricht im Weiteren der Zentrifugation bei einer relativen Zentrifugalkraft (gemessen in xg als Vielfaches der Erdbeschleunigung) von 400 für fünf Minuten und dem anschließenden Verwerfen des gebildeten Überstands, während die Zellen sich am Boden des Reagenzglases absetzen.

Tabelle 16: Mastermix Stimulation.

Reagenzien wurden in einem RPMI-basiertem Medium gelöst und 200 µl Mix pro 200 µl Vollblut zur Stimulation verwendet.

Reagenz	Konzentration im Mix
PMA	32 ng/ml
Ionomycin	3,2 µg/ml
GolgiPlug™	2 µl/ml

2.4.3 Färbung

Die Färbung der zu untersuchenden Strukturen wurde in mehreren Schritten durchgeführt. Einige der Moleküle liegen per se intrazellulär (z.B. Transkriptionsfaktoren) oder können durch Stimuli in den intrazellulären Raum verlagert werden. Beispielsweise kann durch die Exposition gegenüber Phorbolestern wie PMA CD4 internalisiert werden (Ruegg et al., 1992) und sollte deshalb sowohl intra- als auch extrazellulär markiert werden. Auch die Fluoreszenzmarkierung CTLA-4s erfolgte intra- und extra-zellulär, da dieses vor allem in intrazellulären Vesikeln gespeichert und vermehrt erst nach T-Zellaktivierung exprimiert wird (Brunet et al., 1987).

2.4.3.1 Vitalfärbung

Für die Unterscheidbarkeit der vitalen Zellpopulation von den avitalen Zellen wurden die Proben nach der Stimulation mit 1:1000 verdünntem Pacific Orange (PacO) gekoppeltem N-Hydroxysuccinimid gefärbt. Die Substanz kann die intakte Membran vitaler Zellen nicht durchdringen und reagiert daher nur mit den intrazellulären Proteinen avitaler Zellen, deren Membran geschädigt und damit durchlässig ist. So können von vornherein abgestorbene Zellen aus der Betrachtung der durchflusszytometrischen Messung ausgeschlossen werden. Nach einer Inkubation von 20 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte wiederum die Zugabe von 1 ml PBS und das Waschen der Probe.

2.4.3.2 Extrazelluläre Färbung

Die Oberflächenproteine wurden im Anschluss an die Vitalfärbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt. Die Antikörper binden mit den Epitopen ihres variablen Anteils spezifisch an humane Moleküle. Der konstante Teil wiederum trägt den Fluoreszenzfarbstoff, der später im Durchflusszytometer detektiert wird.

Da die Menge der in einer Probe erfassbaren Signale durch die Anzahl der Kanäle im Durchflusszytometer begrenzt ist, wurden pro Proband:in drei unterschiedliche Antikörperpanels gefärbt. Zu 200 µl Patient:innen- beziehungsweise Kontrollblut pro Panel wurde 50 µl *Mastermix „extrazelluläre Färbung“*, gelöst in PBS, gegeben. Die notwendige Konzentration wurde vorab für jeden Antikörper individuell titriert und kann Tabelle 17 entnommen werden.

Die Zellen inkubierten daraufhin 30 Minuten im Dunkeln und bei Raumtemperatur, bevor sie mit 1 ml PBS gewaschen wurden.

Tabelle 17: Antikörper für die extrazelluläre Färbung.

Lösung in PBS. Die Menge bezieht sich auf 50 µl Mastermix, der pro 200 µl zuvor stimuliertes Vollblut verwendet wurde.

Panel 1	Antikörper	Menge
	CD4 PE Dazzle	5 µl
	CD45 BV785	1 µl
	CD25 BV421	3 µl
	CD127 AF647	5 µl
	CD39 PE-Cy7	5 µl
	CCR6 PerCp Cy5.5	5 µl
Panel 2	Antikörper	Menge
	CD4 PE Dazzle	5 µl
	CD45 BV785	1 µl
	CD25 BV421	3 µl
	CD127 AF647	5 µl
	CD39 PE-Cy7	5 µl
	CTLA-4 PE	5 µl
	PD-1 PerCP-Cy5.5	3 µl
Panel 3	Antikörper	Menge
	CD4 PE Dazzle	5 µl
	CD45 BV785	1 µl
	CD25 BV421	3 µl
	CD127 AF647	5 µl
	CD39 PE-Cy7	5 µl

2.4.3.3 Intrazelluläre Färbung

Für die intrazelluläre Färbung wurden die Zellen zuvor mithilfe des *Human FoxP3 Buffer Sets* der Firma BD Pharmingen fixiert und permeabilisiert. Entsprechend der Herstellerangaben wurden je 200 µl Ausgangsvolumen Vollblut 2 ml 1:10 in Wasser verdünnter Puffer A verwendet und die Suspension 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation wurde einmal mit 2 ml PBS/2%FCS gewaschen und daraufhin 500 µl Puffer C, bestehend aus Puffer B, 1:50 gelöst im vorverdünnten Puffer A, hinzugegeben. Nach wiederum 30 Minuten Inkubation erfolgte erneut ein Waschvorgang mit 2 ml PBS/2%FCS und anschließend die intrazelluläre Markierung mit je 50 µl Mastermix „*intrazelluläre Färbung*“ (vgl. Tab. 18) pro Probe und Panel. Auch hier wurde die jeweilig benötigte Antikörperkonzentration im Mix zuvor titriert. Die Inkubationszeit betrug wiederum 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln.

Nach abermaligem Waschen mit 2 ml PBS/2%FCS wurden die Zellen in PBS aufgenommen und durch ein Sieb mit einer Porengröße von 30 µm gefiltert, um Zellaggregate und große Partikel aus der Suspension zu entfernen. Die gefärbten Proben wurden dann bis zur durchflusszytometrischen Analyse bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Tabelle 18: Antikörper für die intrazelluläre Färbung.

Lösung in PBS mit anteilig 2% Zusatz von FCS. Die Menge bezieht sich auf 50 µl Mastermix, der pro 200 µl zuvor stimuliertes Vollblut verwendet wurde.

Panel 1	Antikörper	Menge
	CD4 PE Dazzle	5 µl
	Foxp3 AF488	10 µl
	IL-17 BV711	6,6 µl
	TNFα BV650	3 µl
	RORγt PE	5 µl
Panel 2	Antikörper	Menge
	CD4 PE Dazzle	5 µl
	Foxp3 AF488	10 µl
	TNFα BV650	3 µl
	CTLA-4 PE	5 µl
Panel 3	Antikörper	Menge
	CD4 PE Dazzle	5 µl
	Foxp3 AF488	10 µl
	IL-17 BV711	6,6 µl
	IFNγ PerCp-Cy5.5	3 µl
	TNFα BV650	3 µl
	Helios PE	5 µl

2.4.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Untersuchung einzelner Zellen hinsichtlich morphologischer Eigenschaften sowie des Vorhandenseins spezifischer Strukturen, die vorab über fluoreszierende Antikörper auf oder in der Zelle markiert werden. Dabei durchqueren die in einer Suspension vorliegenden Zellen einzeln Laserstrahlen unterschiedlicher Wellenlänge. Zum einen kann über die Vorwärts- und Seitwärtsstreuung des Laserstrahls beim Passieren einer Zelle eine Aussage über deren Größe und Granularität getroffen werden, wodurch sich die Lymphozyten-Population von anderen Zellreihen abgrenzen lässt. Zum anderen emittieren die Fluorochrome bei Anregung durch den Laser ein charakteristisches Signal, das registriert wird und somit anzeigt, dass die Zelle das entsprechend markierte Antigen exprimiert (Manohar et al., 2021).

Die, wie vorausgehend beschrieben, fluoreszenzmarkierten und fixierten Proben wurden entweder am selben Tag im Anschluss an das Färbeprotokoll oder spätestens am nächsten Tag durchflusszytometrisch erfasst. Bei dem verwendeten Durchflusszytometer handelte es sich um das Modell LSRFortessa™ des Herstellers BD Biosciences mit dem Betriebssystem FACS Diva.

Um die Fluoreszenz der einzelnen Farbstoffe spezifisch zu erfassen, muss der Anteil des Signals, der unspezifisch in nicht dafür vorgesehene Kanäle gelangt, erfasst und rechnerisch

korrigiert werden. Dieser Vorgang der Kompensation erfolgte jeweils direkt der eigentlichen Probenerfassung vorangehend. Für die Kompensationsproben wurden *Beads* verwendet, die mit jeweils 1 µl Fluorochrom-markiertem Antikörper angefärbt wurden. Für die Kompensationsprobe des Vitalfarbstoffes PacO wurden Zellen thermisch abgetötet und angefärbt. Als Negativkontrolle dienten nach dem Erhitzungsvorgang zugesetzte vitale Zellen.

2.4.5 Gating Strategie

Die Auswertung der am Durchflusszytometer erhobenen und als *Flow Cytometry Standard* Datei erfassten Ergebnisse erfolgte mittels der Software FlowJo (Version 10).

Die regulatorischen T-Zellen wurden wie folgt aus der Gesamtpopulation der erfassten Zellen identifiziert (s. Abb. 2): Anhand der Vorwärts- und Seitwärtsstreuung wurden die Lymphozyten markiert. Innerhalb der Lymphozyten-Population erfolgte mittels Vergleich von Zellhöhe gegen Zelloberfläche die Exklusion von Zellaggregaten, um sicherzustellen, dass nur Einzelzellen in die Betrachtung eingehen. Im nächsten Schritt wurden vitale Zellen anhand ihres negativen PacO-Signals markiert. Unter den vitalen Zellen wurden daraufhin die CD45⁺CD4⁺ T-Zellen anhand des CD4- und CD45-Signals identifiziert. Innerhalb dieser Population wiederum wurden die FoxP3⁺ Zellen separiert. Von den FoxP3⁺ Zellen sollten wie bereits beschrieben dann nur diejenigen Zellen mit in die Betrachtung eingehen, die eine hohe CD25-Expression sowie eine niedrige CD127-Expression aufwiesen. Die somit identifizierten CD45⁺CD4⁺FoxP3⁺CD25^{high}CD127^{low} T_{regs} wurden dann auf die Ausprägung der zuvor beschriebenen funktionellen Marker untersucht.

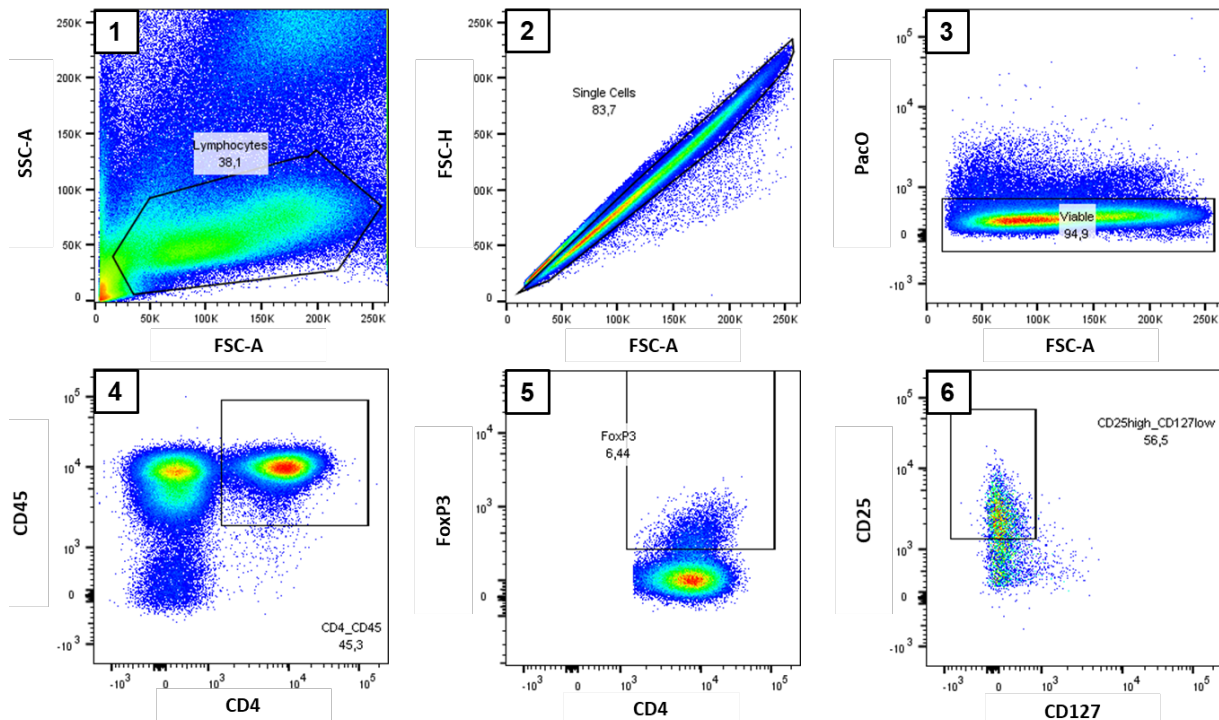


Abbildung 2: Gating-Strategie zur Identifizierung der T_{regs} .

Es erfolgte die Markierung der Lymphozyten (1), gefolgt vom Ausschluss von Zellaggregaten (2) sowie avitalen Zellen (3). Innerhalb der Zellfraktion wurde weiterhin selektiert nach Cluster of Differentiation (CD) -4- und CD45-Expression (4) sowie nach Vorhandensein des Mastertranskriptionsfaktors der regulatorischen T-Zellen (T_{regs}) Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3) (5). Letztlich folgte die Auswahl von Zellen mit hoher CD25- und geringer CD127-Expression (6).

2.4.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels der Software GraphPad Prism (Version 9). Es wurden nicht-parametrische Tests für unabhängige Stichproben gewählt aufgrund der geringen Gruppengröße und da eine Normalverteilung der Werte nicht sicher anzunehmen ist. Für die Mehr-Gruppen-Vergleiche wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Dunns post-Test verwendet. Für die in den Subgruppenanalysen durchgeführten Zwei-Gruppen-Vergleiche wurde der Mann-Whitney-Test angewandt. Ausreißer wurden, mittels *robust regression and outlier removal* (ROUT) Methode identifiziert. Das Maß Q legt für die ROUT-Methode fest, mit welcher Vehemenz Ausreißer ausgeschlossen werden sollen und wurde mit Q=1% angewandt. Die grafische Darstellung erfolgt als Punktdiagramme unter Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung.

Die Korrelation der Ergebnisse der Durchflusszytometrie mit klinischen Parametern wurde mithilfe der Methode nach Pearson untersucht. Die Pearson-Korrelation kann auf kardinalskalierte Daten angewandt werden und untersucht, ob zwischen zwei Variablen ein linearer Zusammenhang vorliegt. Der Korrelationskoeffizient r nimmt einen Wert zwischen 1 (exakter positiver linearer Zusammenhang) und -1 (exakter negativer linearer

Zusammenhang) an. Es wurde von einem starken linearen Zusammenhang ausgegangen bei Werten $> 0,5$ beziehungsweise $< - 0,5$.

Das statistische Signifikanzniveau wurde für alle Auswertungen auf $p < 0,05$ festgelegt. Für die grafische Darstellung des erreichten Niveaus gilt: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ und **** = $p < 0,0001$.

3 Ergebnisse

3.1 Versuchsauswertung

Im Folgenden werden die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung als Gruppenvergleich für jeden untersuchten molekularen Marker dargestellt. Die Ausprägung der Expression bezieht sich, wenn nicht anders angegeben auf den Anteil der Zellen, der ein positives Signal für das jeweilige Protein zeigt, unabhängig davon, in welcher Menge es pro Zelle exprimiert wird. Zusätzlich wurde für CTLA-4, PD-1 und FoxP3 die Mean Fluorescence Intensity (MFI) als geometrisches Mittel erhoben, ein Maß, das mit der Menge gebundenen Antikörpers korreliert und somit Rückschlüsse auf die Anzahl der jeweils betrachteten Moleküle auf der Zelloberfläche bzw. innerhalb einer Zelle ermöglicht.

3.1.1 Anteil der T_{regs} an der Gesamtpopulation der T-Lymphozyten

Es wird kontrovers diskutiert, ob T_{regs} eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese der AIH spielen. In einem ersten Schritt sollte im untersuchten Probenmaterial der Anteil der T_{regs} an der Gesamtpopulation der T-Lymphozyten quantifiziert werden. Neben den Kontrollgruppen Gesunde, PSC- und PBC-Patient:innen erfolgte eine Unterteilung der AIH-Gruppe wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben nach Krankheitsaktivität, wobei der Großteil der Patient:innen einer vollständigen laborchemischen Remission zuzuordnen war. Die aktiven Fälle zeigten zur Hälfte eine *moderate* chronische Aktivität im Sinne einer partiellen Remission mit weiterhin leicht erhöhtem ALAT. Die Fälle *schwerer* Aktivität zeigten ein akutes klinisches Bild mit starker Erhöhung der Transaminasen als Ausdruck der akuten Leberschädigung (vgl. Tab. 12).

In der Gruppe der AIH-Fälle mit laborchemisch hoher Aktivität (mit einem Serum-ALAT von mehr als dem dreifachen der oberen Norm, entsprechend > 150 U/l für männliche und > 105 U/l für weibliche Erkrankte) war zu erkennen, dass im Vergleich mit den anderen Gruppen die T_{regs} mit einem Mittelwert von 4,07 % einen höheren Anteil an den erfassten CD4⁺ T-Zellen hatten, also bei schwerer Erkrankung tendenziell prozentual mehr T_{regs} im peripheren Blut vorlagen (vgl. Abb. 3A). Signifikanz ($p < 0,05$) erreichte die Abweichung im Vergleich zu den Fällen in Remission ($M = 1,92 \%$, $p = 0,0142$) sowie zu den PBC-Erkrankten ($M = 1,65 \%$, $p = 0,0111$). Im Vergleich mit den AIH-Patient:innen mit moderater Aktivität, bei denen der T_{reg}-Anteil durchschnittlich bei 1,97% lag, zeigte sich eine Tendenz für einen höheren relativen T_{reg}-Anteil bei schwerer Aktivität mit $p = 0,0843$. Im Vergleich zur Gesundkohorte konnte sich keine eindeutige Abweichung in dem relativen Anteil der T_{regs} nachweisen lassen ($M = 2,57 \%$, $p = 0,3670$). Die AIH-Patient:innen in Remission sowie

solche mit moderater Aktivität zeigten hingegen keinen erhöhten T_{reg} -Anteil verglichen mit den gesunden Proband:innen (jeweils $p > 0,9999$).

FoxP3 ist der Mastertranskriptionsfaktor der T_{regs} . Alle in dieser Arbeit als T_{reg} identifizierten Zellen weisen demnach ein positives Signal für FoxP3 auf. Um Rückschlüsse auf die Menge des pro T_{reg} exprimierten FoxP3s zu schließen, erfolgte im nächsten Schritt die Untersuchung der FoxP3-MFI gated auf die $CD4^+CD45^+FoxP3^+CD25^{high}CD127^{low}$ T_{regs} (vgl. Abb. 3B). Der Gruppenvergleich zeigte eine mengenmäßig recht homogene FoxP3-Expression der Gruppen mit Ausnahme der AIH-Patient:innen mit hoher Krankheitsaktivität. Hier stellte sich die MFI mit einem Mittelwert von 1.196 im Vergleich zu den Patient:innen in Remission ($M = 751$, $p = 0,0166$) und den Gesunden ($M = 746,1$, $p = 0,0023$) signifikant erhöht dar. Auch verglichen mit den AIH-Fällen moderater Aktivität ($M = 819,83$) sowie den PBC-Erkrankten ($M = 817$) zeigte sich eine Tendenz ohne Signifikanz (respektive $p = 0,1208$ und $p = 0,1642$).

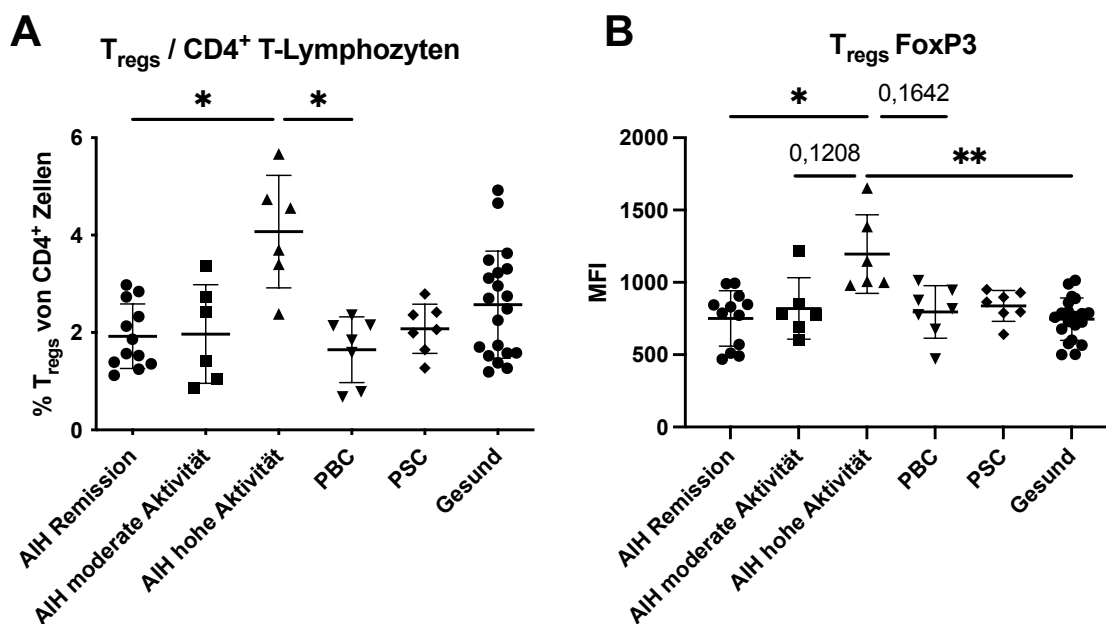


Abbildung 3: Relativer Anteil regulatorischer T-Zellen (T_{regs}) an den $CD4^+$ T-Zellen und FoxP3 Expression der T_{regs} .

A) Anteil der T_{regs} an den Cluster of Differentiation (CD) 4^+ T-Lymphozyten, abgebildet in Prozent. B) Mean Fluorescence Intensity (MFI) als Korrelat für die Menge des pro T_{reg} exprimierten Forkhead-Box-Protein P3s (FoxP3) gated auf $CD45^+CD4^+FoxP3^+CD25^{high}CD127^{low}$ Zellen. Darstellung des Mittelwertes mit Standardabweichung. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$.

Zusätzlich zu der in Abb. 3A dargestellten Betrachtung der T_{regs} als Anteil der $CD45^+CD4^+$ Zellen wurde der Anteil der T_{regs} an allen $CD45^+$ Lymphozyten erhoben, um zu untersuchen, ob der Abweichung eine unterschiedliche Häufigkeit von $CD4^+$ Zellen in den verschiedenen Gruppen zugrunde liegen könnte. Für die relative Häufigkeit der T_{regs} ergab sich in Bezug auf alle $CD45^+$ Zellen ein ähnliches Bild wie im Verhältnis zu den $CD45^+CD4^+$ T-Lymphozyten.

Der T_{reg} -Anteil war in der Gruppe der hohen AIH-Aktivität am höchsten ($M = 1,85 \%$), zeigte jedoch keine signifikante Abweichung zu den Vergleichsgruppen. Lediglich in Bezug auf die PBC-Gruppe ließ sich eine stärkere Tendenz nachweisen ($M = 0,87 \%$, $p = 0,0580$) (vgl. Abb. 4A).

Der Anteil der $CD4^+$ Zellen an den $CD45^+$ Lymphozyten lag über alle Gruppen hinweg durchschnittlich zwischen 46,7 % bei den AIH-Fällen mit hoher laborchemischer Aktivität und 54,8 % bei den AIH-Patient:innen in Remission. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten sich nicht (vgl. Abb. 4B).

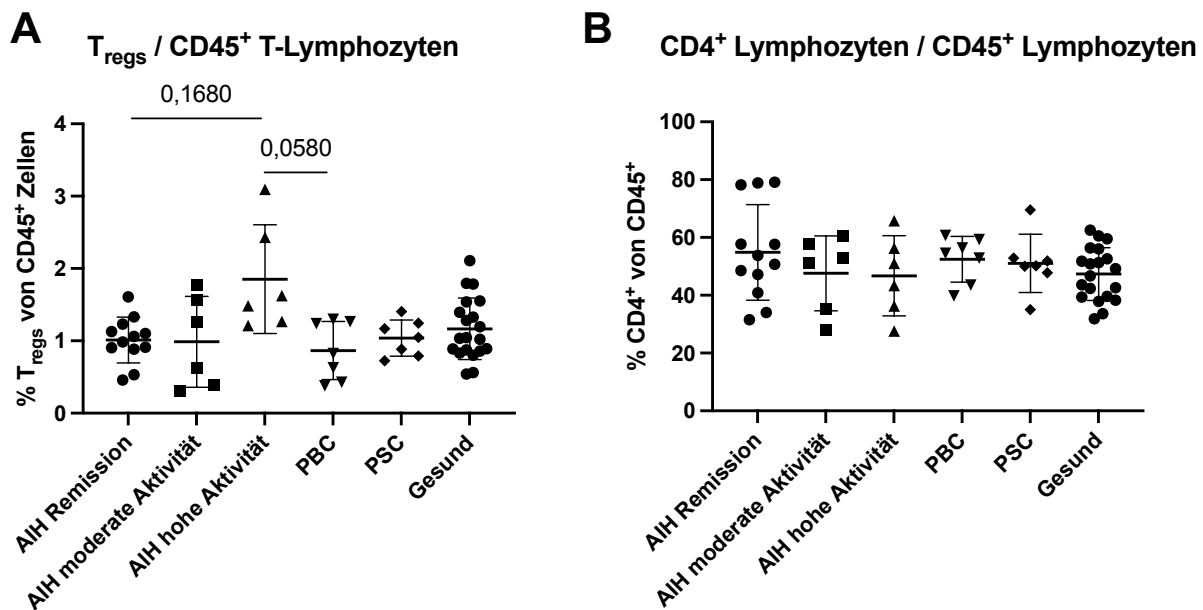


Abbildung 4: Relativer Anteil regulatorischer T-Zellen (T_{regs}) und $CD4^+$ Zellen an allen $CD45^+$ Lymphozyten.

A) Regulatorische T-Zellen als prozentualer Anteil aller Cluster of Differentiation (CD) 45^+ T-Lymphozyten.
 B) $CD4^+CD45^+$ Zellen als prozentualer Anteil aller $CD45^+$ Zellen. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung.

3.1.2 T_{reg}-spezifische Expression der untersuchten Oberflächenproteine

CTLA-4

Die Expression des als Immuncheckpoint-Molekül bezeichneten CTLA-4s in T_{regs} wich in der Gruppe der AIH-Fälle unabhängig von der Krankheitsaktivität von keiner der Vergleichsgruppen signifikant ab. In der Gruppe der AIH mit laborchemisch hoher Aktivität fallen Fälle mit ausgeprägt niedrigem Anteil CTLA-4⁺ T_{regs} auf. Insgesamt erreicht die Gruppe mit einem Mittelwert von 74,57 % jedoch im Vergleich zu keiner Referenzgruppe eine signifikante Abweichung ($p > 0,9999$ im Vergleich zur Gesundkohorte mit $M = 86,69$ % und den Fällen in Remission mit $M = 89,13$ %; $p = 0,3327$ im Vergleich zu den Fällen moderater Aktivität mit $M = 91,67$ %) (vgl. Abb. 5A).

Auch die Betrachtung der MFI gated auf die CD4⁺CD45⁺FoxP3⁺CD25^{high}CD127^{low} Zellen liefert keinen Hinweis drauf, dass die Menge des pro T_{reg} exprimierten CTLA-4s bei AIH-Patienten signifikant höher oder niedriger als in den Vergleichsgruppen ist. Am niedrigsten ist die MFI bei den AIH-Patient:innen mit moderater laborchemischer Aktivität ($M = 17.736,8$) am höchsten in der PSC-Gruppe ($M = 31.737,3$). In der Gesundkohorte liegt sie bei durchschnittlich 21.040,1 (vgl. Abb. 5B).

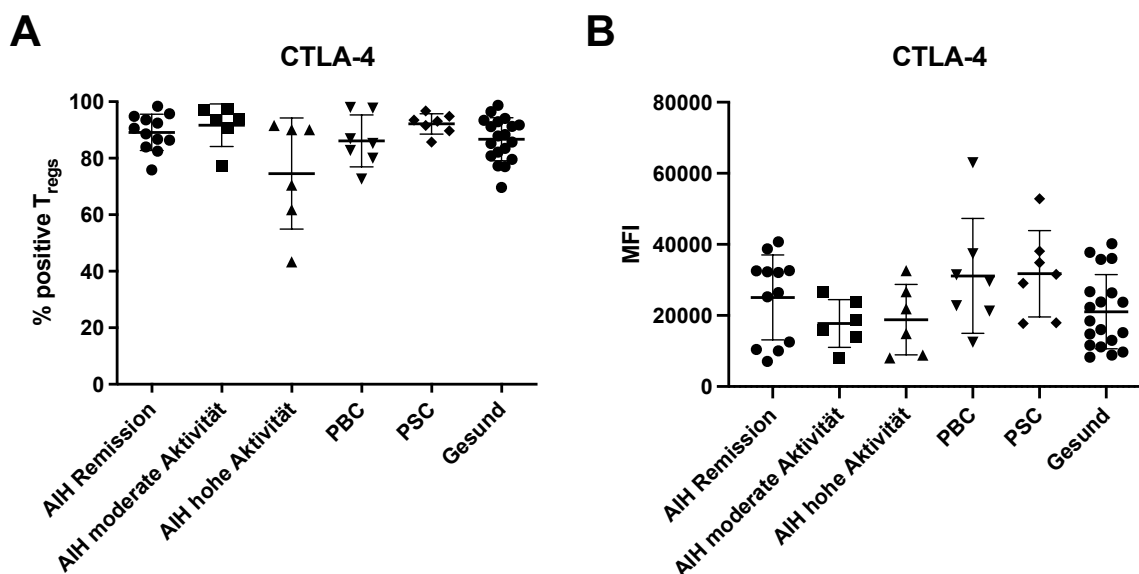


Abbildung 5: CTLA-4 Expression der regulatorischen T-Zellen (T_{regs}).

A) Anteil der untersuchten Zellen, die ein positives Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4 (CTLA-4) Signal aufwiesen in Prozent. B) Mean Fluorescence Intensity (MFI) als Korrelat für die Menge des pro T_{reg} exprimierten CTLA-4s. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung.

PD-1

Auch für das Immuncheckpoint-Molekül PD-1 konnte im untersuchten Patientenkollektiv keine abweichende Häufigkeit der Expression auf T_{regs} beobachtet werden. Am ehesten zeigen sich einzelne Fälle erhöhter PD-1 Expression bei den AIH-Fällen moderater und hoher Aktivität sowie in der PBC-Vergleichsgruppe (vgl. Abb. 6A). Eine ausgeprägte Tendenz zur Signifikanz ergibt sich nur im Vergleich der akuten Fälle hoher Aktivität ($M = 13,30\%$) mit der PSC-Gruppe ($M = 2,36\%$, $p = 0,0597$).

Auch für PD-1 wurde die MFI bezogen auf die $CD4^+CD45^+FoxP3^+CD25^{high}CD127^{low}$ T_{regs} erhoben. Für die AIH-Gruppen ließ sich diesbezüglich keine signifikante Abweichung zu den gesunden Kontrollpersonen nachweisen. Lediglich zeigte nebenbefundlich die PSC-Gruppe mit durchschnittlich 5.560,86 eine tendenziell jedoch nicht signifikant geringere MFI als die Gruppe der Gesunden ($M = 9.050,35$, $p = 0,0897$) sowie als die AIH-Patient:innen mit moderater ($M = 11.054,8$, $p = 0,0730$) und hoher ($M = 9.349,67$, $p = 0,1186$) laborchemischer Aktivität (vgl. Abb. 6B).

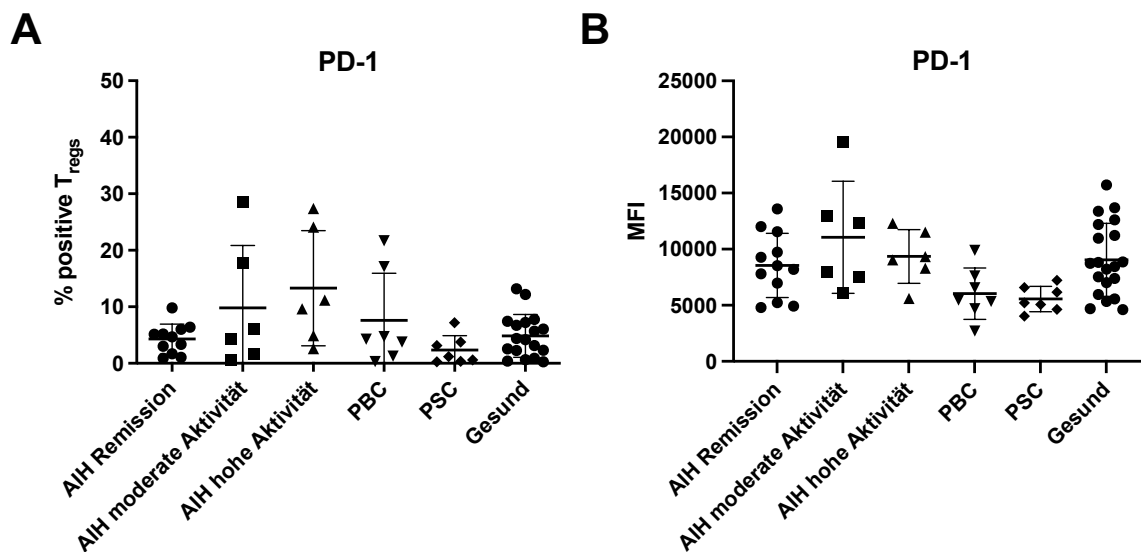


Abbildung 6: PD-1 Expression der regulatorischen T-Zellen (T_{regs}).

A) Anteil der untersuchten Zellen, die ein positives Programmed cell death protein 1 (PD-1) Signal aufwiesen in Prozent. B) Mean Fluorescence Intensity (MFI) als Korrelat für die Menge des pro T_{reg} exprimierten PD-1. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung.

CCR6

Für den Chemokinrezeptor CCR6 zeigten sich im Gruppenvergleich keine signifikanten Abweichungen hinsichtlich der Expression (vgl. Abb. 7). Unter Berücksichtigung aller Werte zeichnete sich ein statistischer Trend zu einem vermehrten Vorhandensein von CCR6 auf den T_{regs} der AIH-Patient:innen mit der höchsten laborchemischen Aktivität ($M = 39,68\%$) im Vergleich zur Gesundkohorte ($M = 20,25\%$) ab ($p = 0,0826$, vgl. Abb. 7A).

Innerhalb der Gruppe der AIH-Fälle hoher Aktivität zeigt sich mit $86,7\%$ CCR6⁺ T_{regs} ein deutlich von allen übrigen erhobenen Datenpunkten abweichender Wert (vgl. Abb. 7A), der sich statistisch nach ROUT-Methode als Ausreißer qualifiziert. Schließt man diesen in Abb. 7A mit einem Stern-Symbol markierten Wert aus der Analyse aus, so ist die Abweichung der AIH-Gruppe hoher Aktivität ($M = 30,28\%$) von der Gesundkohorte deutlich schwächer ausgeprägt (vgl. Abb. 7B $p = 0,3102$).

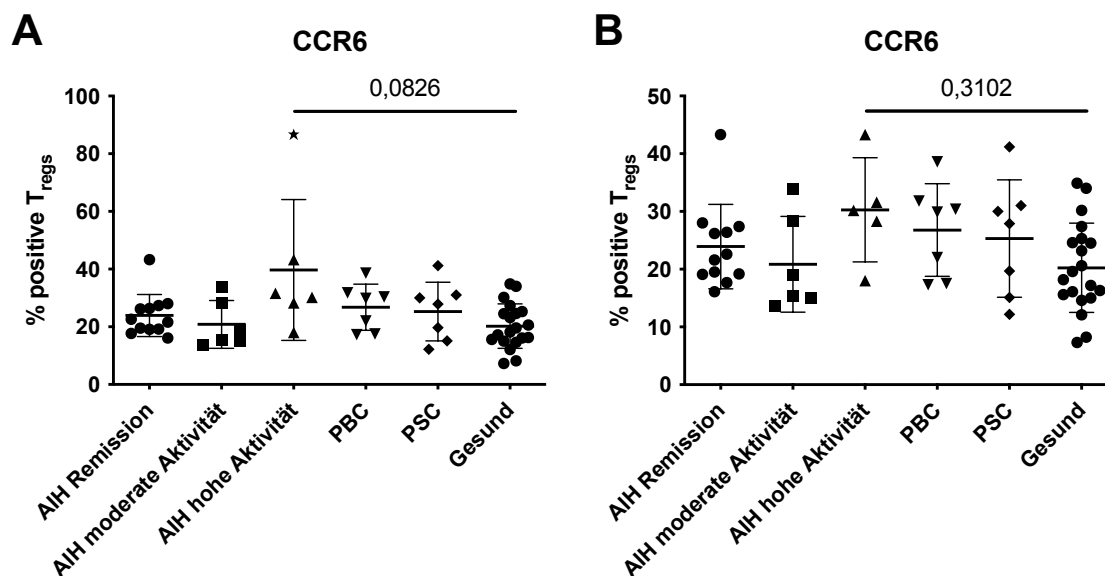


Abbildung 7: CCR6 Expression der regulatorischen T-Zellen (T_{regs}).

Anteil der untersuchten Zellen, die ein positives Chemokine receptor 6 (CCR6) Signal aufweisen in Prozent. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung. A) zeigt die Analyse aller erhobenen Datenpunkte. Der mit einem Stern markierte Wert wurde mittels Robust regression and Outlier removal (ROUT)-Methode als möglicher Ausreißer identifiziert. B) zeigt den Gruppenvergleich unter Ausschluss des entsprechenden Wertes.

CD39

Das Enzym CD39 war auf den untersuchten T_{regs} mit Ausnahme der PBC-Kohorte innerhalb aller Gruppen sehr individuell unterschiedlich häufig exprimiert (vgl. Abb. 8). In der Gruppe der aktiv AIH-Erkrankten war die Streuung, gemessen an der Standardabweichung (SD), am größten ($M = 51,92 \%$, $SD = 34,35 \%$), jedoch auch in der Gruppe der Patient:innen in Remission ($M = 58,4 \%$, $SD 22,21 \%$) und in der Gesundheitsgruppe ($M = 52,76 \%$, $SD 23,02 \%$) war die Spannweite der Werte hoch. Anhand der erhobenen Daten ließ sich für keine Kohorte eine signifikant abweichende Expression zeigen – auch die PBC-Gruppe, in der die Streuung am geringsten ausgeprägt und die durchschnittliche CD39-Expression am höchsten war ($M = 72,3 \%$, $SD 7,71 \%$), wich nicht signifikant von den übrigen Gruppen ab.

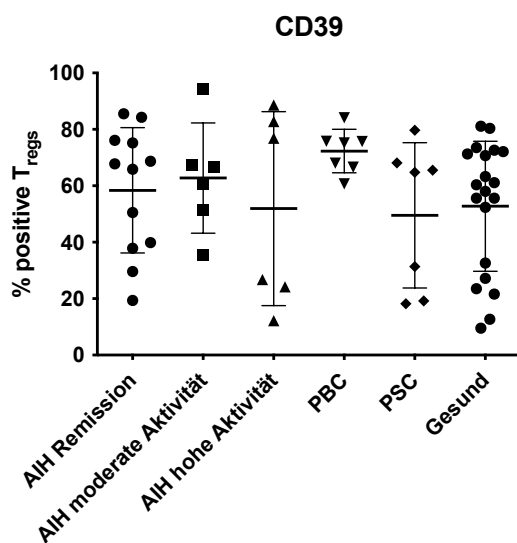


Abbildung 8: CD39 Expression der regulatorischen T-Zellen (T_{regs}).

Anteil der untersuchten Zellen, die ein positives Cluster of differentiation (CD)39 Signal aufweisen in Prozent. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung.

3.1.3 T_{reg}-spezifische Expression der untersuchten Transkriptionsfaktoren

Helios

Für den Transkriptionsfaktor Helios zeigte sich insgesamt eine ähnlich häufige Expression der T_{regs} in allen Untersuchungskohorten mit dem höchsten Mittelwert von 72,67 % bei den Patient:innen mit moderater AIH-Aktivität und dem niedrigsten Durchschnitt von 62,57 % in der PBC-Gruppe mit einer vergleichsweise geringen Streuung ($SD = 5,99$ % bzw. $10,31$ %). Für keine Kohorte konnte ein Anhaltspunkt für ein signifikantes Abweichen der Häufigkeit der Helios-Expression auf den T_{regs} gefunden werden (vgl. Abb. 9).

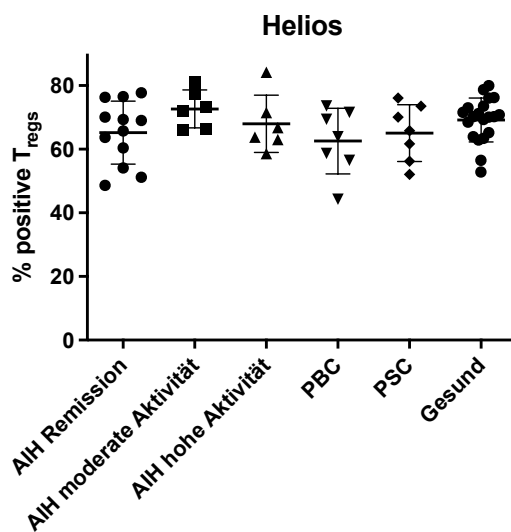


Abbildung 9: Helios Expression der regulatorischen T-Zellen (T_{regs}).

Anteil der untersuchten Zellen, die ein positives Helios Signal aufweisen in Prozent. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung.

ROR γ t

ROR γ t, der Mastertranskriptionsfaktor von T_H17-Zellen, der auch von T_H17-like T_{regs} exprimiert wird, wurde von den untersuchten T_{regs} der AIH-Patient:innen in ähnlicher Häufigkeit exprimiert wie in den Vergleichsgruppen (vgl. Abb. 10). Für die Betrachtung der Proband:innen mit laborchemisch hoher Erkrankungsaktivität ($M = 10,84\%$) zeigte sich eine leichte, jedoch nicht signifikante Abweichung des Mittelwerts im Vergleich zur Gesundkohorte ($M = 3,92\%$, $p = 0,3905$) und den AIH-Fällen in Remission ($M = 3,95\%$, $p = 0,3238$). Zu bemerken ist hier, dass insbesondere ein einzelner Wert stark nach oben abwich, der sich jedoch bei der Überprüfung statistisch nicht als Ausreißer identifizieren ließ. Nebenbefundlich zeigten sich auch in der PSC-Kohorte Fälle mit höherer ROR γ t-Expression, insgesamt stellte sich aber auch diese Abweichung bei einem Mittelwert von $10,01\%$ als nicht-signifikant dar ($p = 0,7471$ im Vergleich zur Gesundkohorte).

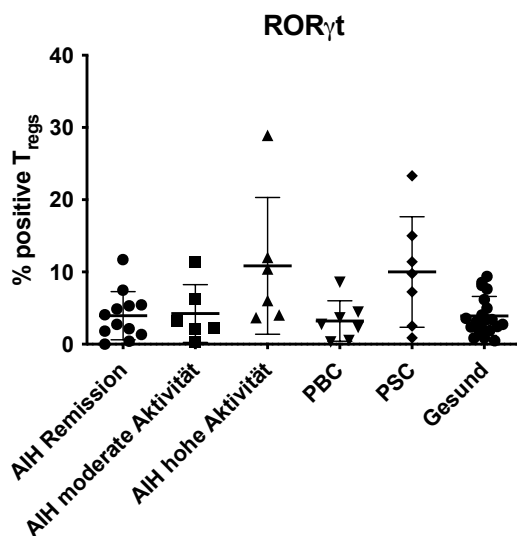


Abbildung 10: ROR γ t Expression der regulatorischen T-Zellen (T_{regs}).

Anteil der untersuchten Zellen, die ein positives Retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t (ROR γ t) Signal aufweisen in Prozent. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung.

3.1.4 T_{reg}-spezifische Expression der untersuchten Zytokine

TNF α

Abbildung 11 stellt den Anteil der T_{regs} dar, der das pro-inflammatorische Zytokin TNF α ausschüttet. Für die AIH-Patient:innen wurde unabhängig von Remission ($M = 17,05\%$) oder Krankheitsaktivität ($M = 16,26\%$ bei moderater AIH-Aktivität, $M = 16,55\%$ bei hoher Aktivität) insgesamt keine vermehrte oder verminderte TNF α -Ausschüttung beobachtet. Auch in der PSC-Gruppe wich die TNF α -Expression mit einem Mittelwert von $22,14\%$ nicht signifikant von der Gesundkohorte ($M = 17,31\%$, $p > 0,9999$) oder den übrigen Vergleichsgruppen ab.

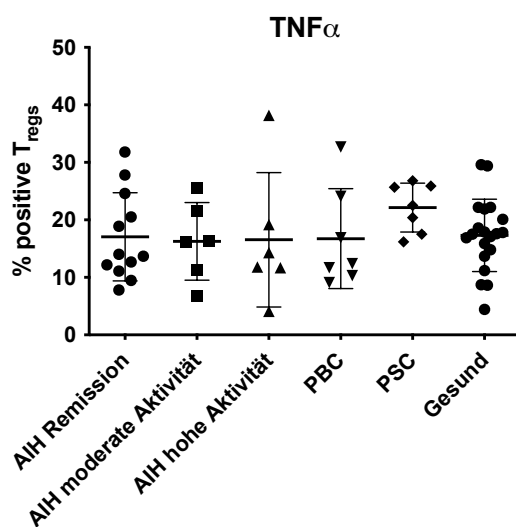


Abbildung 11: TNF α Expression der regulatorischen T-Zellen (T_{regs}).

Anteil der untersuchten Zellen, die ein positives Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) Signal aufweisen in Prozent. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung.

IFN γ

Die Untersuchung von IFN γ zeigte mehrere Fälle mit auffällig häufiger Ausschüttung des proinflammatorischen und für T_H1-like T_{regs} charakteristischen Zytokins durch T_{regs} in der Gruppe der AIH-Patient:innen mit hoher laborchemischer Aktivität ($M = 8,04\%$). Insgesamt jedoch stellte sich für die Gruppe keine signifikante Abweichung dar ($p = 0,5820$) im Vergleich mit der Gesundkohorte, in der durchschnittlich 2,33 % der T_{regs} IFN γ exprimierten sowie im Vergleich zu keiner der anderen Gruppen (jeweils $p > 0,9999$) (vgl. Abb. 12).

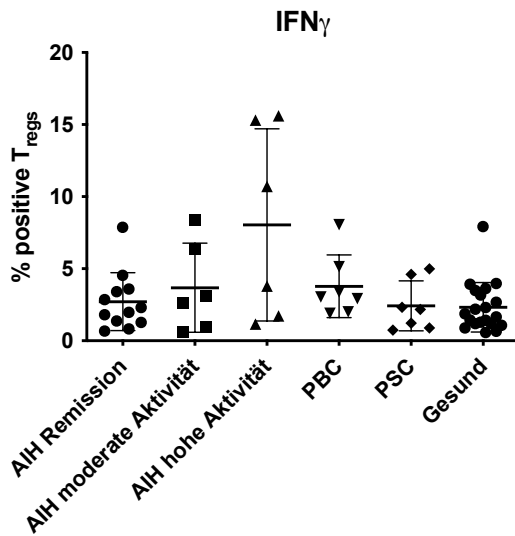


Abbildung 12: IFN γ Expression der regulatorischen T-Zellen (T_{regs}).

Anteil der untersuchten Zellen, die ein positives Interferon gamma (IFN γ) Signal aufweisen in Prozent. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung.

IL-17

Auch bei der Überprüfung des Anteils IL-17⁺ T_{regs}, die als potenziell T_H17-like zu betrachten wären, konnte im Gruppenvergleich keine signifikante Abweichung hinsichtlich der Häufigkeit nachgewiesen werden (vgl. Abb. 13). Sowohl in der Gruppe der AIH-Patient:innen in Remission als auch in der PBC-Gruppe gab es jeweils einen Datenpunkt (vgl. Abb. 13A), der sich als möglicher Ausreißer qualifizierte, jedoch keinen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis hatte (vgl. Abb. 13B). Den größten Anteil IL-17⁺ T_{regs} zeigten die Fälle moderater AIH-Aktivität ($M = 2,38\%$). Im Vergleich dazu waren es durchschnittlich 1,44 % IL-17⁺ T_{regs} in der Gesundkohorte.

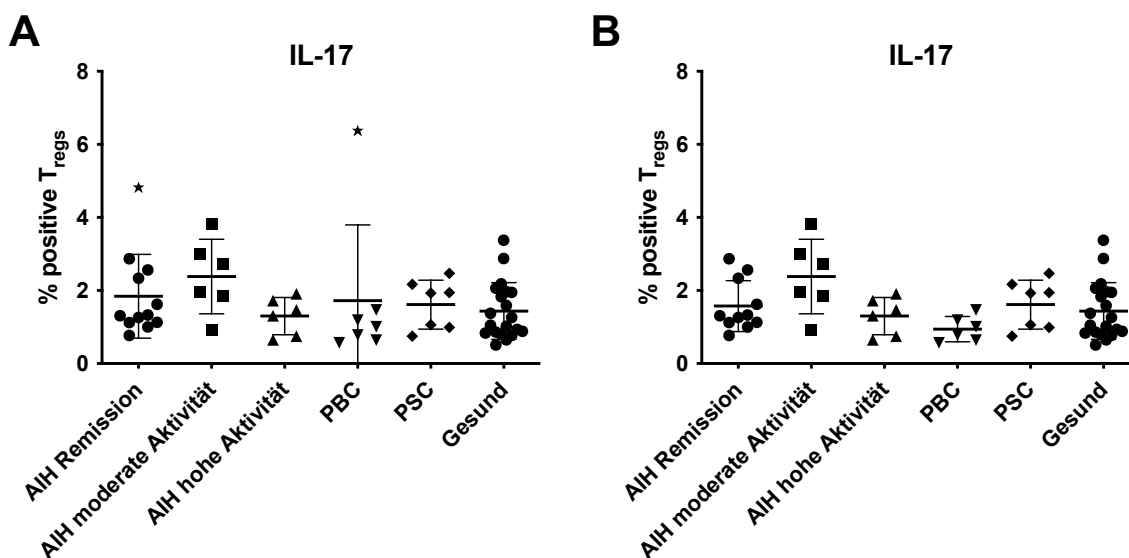


Abbildung 13: IL-17-Expression der regulatorischen T-Zellen (T_{regs}).

Anteil der untersuchten Zellen, die ein positives Interleukin (IL)-17 Signal aufwiesen in Prozent. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung. A) zeigt die Analyse aller erhobenen Datenpunkte. Die mit einem Stern markierten Werte wurden mittels Robust regression and Outlier removal (ROUT)-Methode als mögliche Ausreißer identifiziert. B) zeigt den Gruppenvergleich unter Ausschluss der entsprechenden zwei Werte.

3.2 Korrelationsanalyse der klinischen Parameter

Um Anhaltspunkte für die teilweise hohe Streuung innerhalb der Gruppen zu finden und den Einfluss der Krankheitsaktivität auf den Phänotyp der T_{regs} und umgekehrt zu prüfen, wurde die Ausprägung der Messwerte mittels Methode nach Pearson auf einen Zusammenhang mit den klinischen Verlaufsparemtern der Patient:innen untersucht. Auch das Alter der Erkrankten, das keinen Verlaufsparemter darstellt, aber als möglicher Störfaktor in Frage kommt, wurde als Variable mit in die Korrelationsanalyse eingeschlossen.

Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse der Korrelationsanalyse, einmal für die gesamte Gruppe aller 24 eingeschlossenen AIH-Patient:innen (vgl. Abb. 14A) und gesondert für die zwölf Fälle, deren laborchemische Werte eine aktive Erkrankung im Sinne einer aktuellen Leberschädigung indizierten (vgl. Abb. 14B) sowie für die Subgruppe der sechs Fälle, deren Laborparameter eine schwere Krankheitsaktivität nahelegten (vgl. Abb. 14C). Tabelle 19 greift die aus Abbildung 14 ersichtlichen signifikanten Korrelationen für die unterschiedlich eingeteilten Betrachtungsgruppen auf.

Grundsätzlich erreichte in der Gruppe der schweren aktiven Fälle lediglich einer der berechneten Zusammenhänge das Signifikanzniveau. Hier ist zu bedenken, dass es sich mit sechs Proband:innen um eine sehr kleine Gruppe handelte. Die Resultate aus dieser Kohorte sollen hier daher eher zur Plausibilitätsprüfung im Kontext der anderen Betrachtungsgruppen herangezogen werden, als alleinstehend als Ergebnis gewertet zu werden.

Die Ausprägung von CTLA-4 auf den untersuchten T_{regs} zeigte mit mehreren der erhobenen Verlaufsparemter eine Korrelation (vgl. Abb. 14A). Albumin, welches bei Einschränkung der Lebersynthese vermindert sein kann, lag der Analyse zu Folge gleichsinnig erniedrigt eher bei einer niedrigeren CTLA-4 Expression vor ($p = 0,0308$). Hingegen fand sich ein höheres Bilirubin und γ GT, wie sie bei einer Leberschädigung vorliegen können, zusammen mit einer verminderten CTLA-4 Expression (jeweils $p < 0,0001$). Ebenso verhielt es sich mit CTLA-4 und dem Anteil der T_{regs} an der Gesamtheit der T-Lymphozyten. Bei einem höheren relativen Anteil der T_{regs} wurde auf diesen seltener CTLA-4 nachgewiesen ($p = 0,0018$). Die Höhe des Leberenzymes ASAT korrelierte ebenfalls negativ mit der CTLA-4 Expression ($p = 0,0113$).

Für IL-17 ließ sich ebenfalls eine Korrelation mit mehreren Parametern beobachten, jedoch lediglich signifikant für die Betrachtung aller 12 Fälle aktiver Erkrankung. Eine vermehrte IL-17-Ausschüttung trat dort im Zusammenhang mit niedrigeren ASAT- ($p = 0,0495$), ALP- ($p = 0,0206$) und γ GT-Werten ($p = 0,0434$) auf. Für ALAT blieb die Korrelation knapp unter dem festgelegten Signifikanzniveau ($p = 0,0671$). Bei höheren IL-17

Werten war darüber hinaus der Anteil der T_{regs} an der Gesamt-T-Zellzahl niedriger ($p = 0,0078$). Trotz der in Abhängigkeit der vorgestellten Erkrankungsparameter tendenziell abnehmenden IL-17-Expression zeigte sich jedoch wie in Abbildung 13 dargestellt im Gruppenvergleich keine signifikant niedrigere Expression in den AIH-Gruppen als in den Kontrollgruppen.

Schaut man auf die Analyse der Korrelationen für die erhobenen T_{reg} -Marker untereinander, war auffällig, dass Marker, für die man ein gemeinsam vermehrtes oder verringertes Auftreten erwarten könnte, keinen linearen Zusammenhang zeigten. Beispielsweise lagen höhere Ausprägungen des Transkriptionsfaktors ROR γ t nicht positiv korreliert mit einer höheren Ausschüttung von IL-17 vor. Auch die beiden Immuncheckpoint-Moleküle CTLA-4 und PD-1 oder die pro-inflammatorischen Zytokine TNF α , IFN γ und IL-17 zeigten untereinander kein zusammenhängendes Expressionsmuster. Lediglich für PD-1 und IFN γ ließ sich eine signifikante positive Korrelation untereinander nachweisen (vgl. Abb. 14A, $r = 0,760$, $p = 0,0001$).

Der relative Anteil der T_{regs} an den gesamten $CD4^+$ Lymphozyten korrelierte wie bereits beschrieben negativ mit der Häufigkeit IL-17 $^+$ sowie CTLA-4 $^+$ T_{regs} . Hingegen deutete sich eine positive Korrelation mit den laborchemischen Parametern ASAT ($p = 0,0008$), ALP ($p < 0,0001$), γ GT ($p < 0,0001$) und IgG ($p = 0,0047$) an.

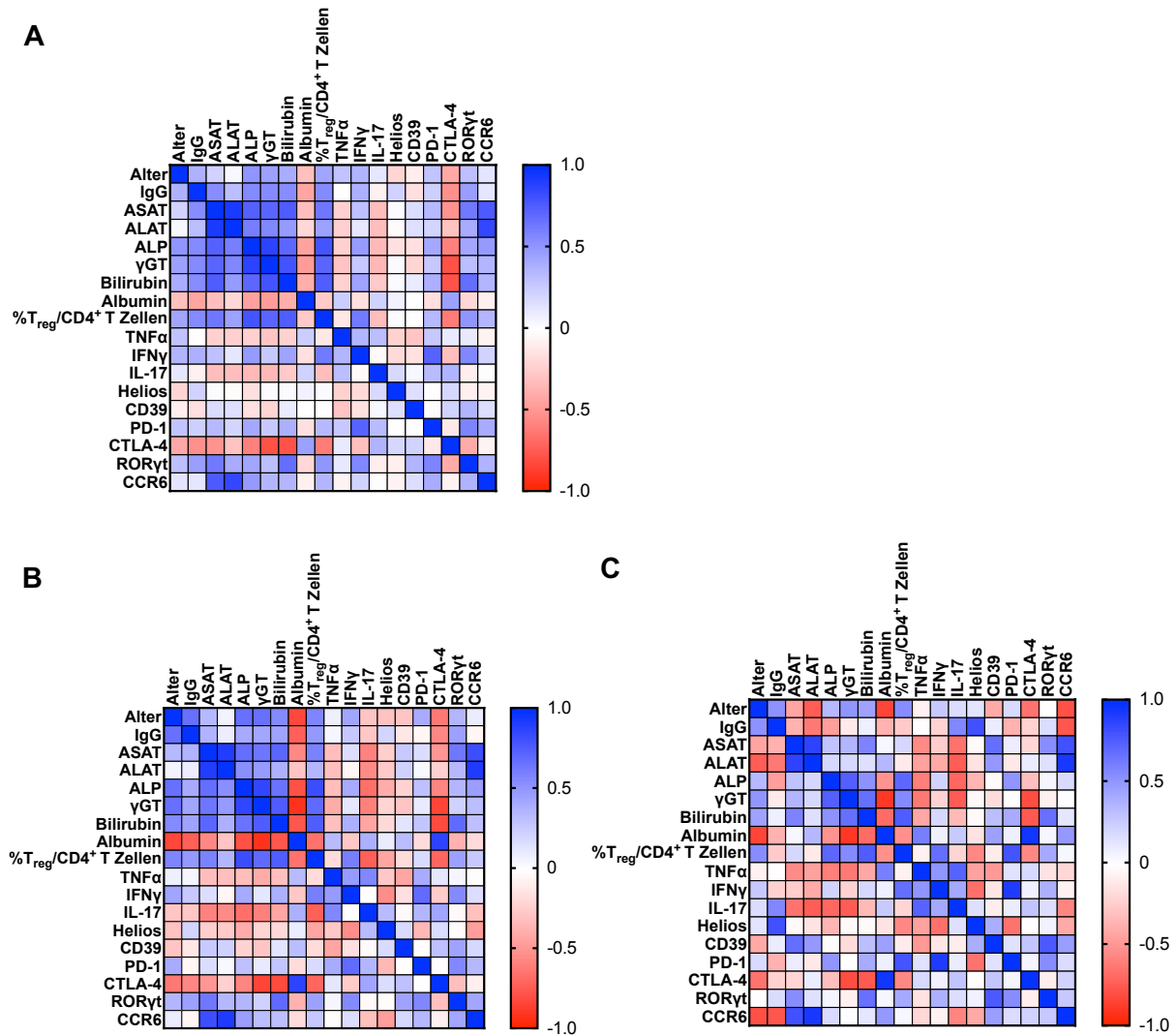


Abbildung 14: Zusammenhang zwischen ausgewählten klinischen Verlaufsparemtern und Expression der erhobenen Marker auf regulatorischen T-Zellen (T_{reg} s).
 Grafische Darstellung der Pearson Korrelation für A) die Gruppe aller untersuchten Autoimmunhepatitis (AIH)-Fälle ($n=24$), B) die Gruppe der aktiven AIH-Fälle mit schwerer und moderater Erkrankung ($n=12$) und C) die Gruppe schwerer Aktivität ($n=6$). Blau repräsentiert einen positiven linearen Zusammenhang, rot einen negativen. Die Intensität der Farbe nimmt jeweils Richtung 1 (blau) beziehungsweise -1 (rot) zu.

Tabelle 19: Auszug linearer Zusammenhänge zwischen den untersuchten Markern exprimiert von T_{reg} und klinischen Parametern.

Bezogen auf die Gruppe aller AIH-Fälle (AIH, $n = 24$), aktive Fälle mit schwerer und moderater Erkrankung (aAIH, $n = 12$) sowie akute Fälle schwerer Aktivität (saAIH, $n = 6$). r = Korrelationskoeffizient, p = Signifikanzwert. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ und **** = $p < 0,0001$.

Marker	Parameter	r (p) AIH	r (p) aAIH	r (p) saAIH
CTLA-4	Albumin	0,451 (*)	0,864 (**)	0,949 (*)
CTLA-4	Bilirubin	- 0,772 (****)	- 0,813 (**)	- 0,743
CTLA-4	γ GT	- 0,779 (****)	- 0,828 (**)	- 0,801
CTLA-4	% $T_{reg}/CD4^+$	- 0,604 (**)	- 0,699 (*)	- 0,555
CTLA-4	ASAT	- 0,508 (*)	- 0,496	- 0,201
CTLA-4	IgG	- 0,523 (**)	- 0,563	- 0,226
IL-17	% $T_{reg}/CD4^+$	- 0,322	- 0,723 (**)	- 0,207
IL-17	ASAT	- 0,323	- 0,577 (*)	- 0,648
IL-17	ALP	- 0,336	- 0,656 (*)	- 0,693
IL-17	γ GT	- 0,342	- 0,590 (*)	- 0,739
% $T_{reg}/CD4^+$	ASAT	0,639 (****)	0,589 (*)	0,197
% $T_{reg}/CD4^+$	ALP	0,789 (****)	0,820 (**)	0,708
% $T_{reg}/CD4^+$	γ GT	0,715 (****)	0,698 (*)	0,553
% $T_{reg}/CD4^+$	IgG	0,752 (**)	0,491	- 0,256

Zusätzlich wurde für die Variable Alter, analog zu den zuvor beschriebenen Verlaufsparemtern, das Vorliegen einer Korrelation überprüft.

Für CTLA-4 legten die Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Pearson in der AIH-Gruppe einen leicht ausgeprägten negativen Zusammenhang mit dem Alter nahe ($r = - 0,414$, $p = 0,0446$, vgl. Abb. 14 und Tab. 20). Sollte das Alter als unabhängige Variable grundsätzlich einen Einfluss auf die Ausprägung des Markers gehabt haben, wäre zu erwarten, dass sich dies ebenfalls in der Kontrollgruppe der Gesunden widerspiegeln würde. Dort zeigte sich in der Überprüfung keine signifikante Korrelation ($r = 0,122$, $p = 0,6201$, Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich zeigte sich in der Korrelationsanalyse ein signifikanter jedoch ebenfalls eher schwach ausgeprägter positiver Zusammenhang zwischen Patient:innenalter und relativem T_{reg} -Anteil ($r = 0,433$, $p = 0,0346$, vgl. Abb. 14 und Tab. 20). Auch dieser ließ sich in der Gesundkohorte nicht nachweisen ($r = - 0,452$, $p = 0,0453$, Daten nicht gezeigt).

Tabelle 20: Auszug linearer Zusammenhänge zwischen den untersuchten Markern sowie klinischen Parametern und dem Patient:innenalter.

Bezogen auf die Gruppe aller AIH-Fälle (AIH, $n = 24$), aktive Fälle (aAIH, $n = 12$) sowie aktive Fälle schwerer Aktivität (saAIH, $n = 6$). r = Korrelationskoeffizient, p = Signifikanzwert. * = $p < 0,05$.

Variable 1	Variable 2	r (p) AIH	r (p) aAIH	r (p) saAIH
Alter	CTLA-4	- 0,414 (*)	- 0,617 (*)	- 0,642
Alter	% T _{reg} /CD4 ⁺	0,433 (*)	0,574	0,539

3.3 Subgruppenanalysen

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Subgruppenanalysen unterschieden nach Einnahme immunsuppressiver Medikation im Allgemeinen sowie Steroideinnahme im Speziellen gezeigt. Die Gruppeneinteilung und daraus resultierende Charakteristika wurden in Kapitel 2.3 vorgestellt.

3.3.1 Überprüfung der AIH-Kohorte hinsichtlich des Einflusses einer Immunsuppression auf den Phänotyp der T_{regs}

Wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben gab es unter den 24 untersuchten AIH-Patient:innen sechs Therapie-naive beziehungsweise Patient:innen, die zum Zeitpunkt der Probengewinnung keinerlei Immunsuppression einnahmen (vgl. Tab. 13). Die daraus resultierenden Gruppen unterschieden sich deutlich hinsichtlich der ALAT-Serumlevel mit durchschnittlich 99,2 U/l in der Gruppe ohne Immunsuppression und 327,5 U/l mit Immunsuppression, wobei in beiden Gruppen Fälle in Remission und mit aktiver Erkrankung vertreten waren.

Der relative Anteil der T_{regs} an den CD4⁺ Lymphozyten stellte sich ohne Immunsuppression eher höher dar ($M = 3,06$ %) als bei den Patient:innen, die eine entsprechende Medikation einnahmen ($M = 2,28$ %), jedoch ohne signifikantes Ergebnis ($p = 0,1192$) (vgl. Abb. 15).

Eine signifikante Abweichung im Vergleich der beiden Gruppen, zeigte sich hingegen bei der Häufigkeit, mit der die T_{regs} den Transkriptionsfaktor Helios exprimierten. Dieser wurde bei fehlender Immunsuppression signifikant seltener exprimiert ($M = 60,67$ %) als unter Medikamenteneinnahme ($M = 70,14$ %) ($p = 0,0094$). Eine ähnliche Tendenz zeigte sich mit Blick auf IL-17 mit durchschnittlich 1,2 % IL-17⁺ T_{regs} ohne Medikation und 2,06 % IL-17⁺ T_{regs} mit Immunsuppression, jedoch ohne das Signifikanzniveau zu erreichen ($p = 0,0542$).

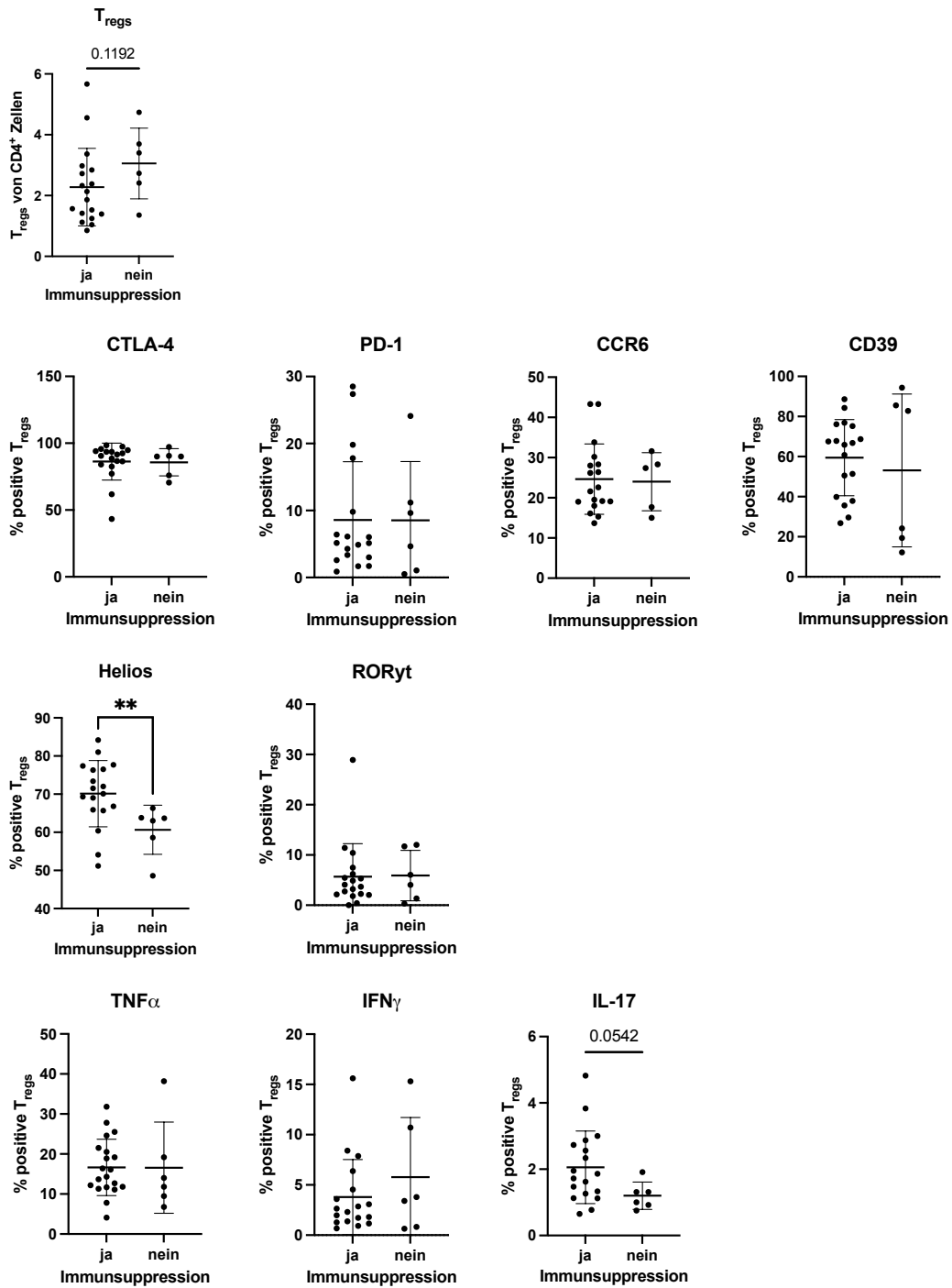


Abbildung 15: Anteil der regulatorischen T-Zellen (T_{regs}) an Cluster of differentiation (CD) 4^+ Zellen sowie Expression der untersuchten Marker auf T_{regs} unterschieden nach Einnahme immunsupprimierender Medikamente.

Anteil der untersuchten Zellen, die ein positives Signal für den jeweiligen Marker aufweisen in Prozent. $n = 24$ Fälle (Remission und aktive Erkrankung). Darstellung von Mittelwert mit Standardabweichung. ** = $p < 0,01$.

3.3.2 Überprüfung der AIH-Kohorte hinsichtlich des Einflusses einer Steroideinnahme auf den Phänotyp der T_{regs}

Es wurde davon ausgegangen, dass insbesondere die Einnahme von Steroiden in Form von Prednisolon oder Budesonid als potente Immunsuppressiva, potenziell die Expression der untersuchten Marker beeinflusst haben könnte. Entsprechend wurden mittels Gruppenvergleich zusätzlich die acht Patient:innen, die zum Zeitpunkt der Probenentnahme Steroide einnahmen, mit den 16, die eine Steroid-freie Therapie oder keine medikamentöse Behandlung erhielten, verglichen (für die Gruppencharakteristika vgl. Tab. 15, Kapitel 2.3.3).

Abbildung 16 zeigt in der Übersicht die Ausprägung der untersuchten Marker auf den T_{regs} für beide Gruppen im Vergleich. Für keinen der untersuchten Marker konnten signifikant unterschiedliche Ergebnisse bei Steroideinnahme beobachtet werden.

Lediglich für den Transkriptionsfaktor Helios zeigte sich eine nicht signifikante Tendenz mit $p = 0,0607$ für eine vermehrte Expression bei Steroideinnahme mit durchschnittlich 72,53 % Helios⁺ T_{regs} im Vergleich zu 65,39 % Helios⁺ T_{regs} ohne Steroidtherapie (vgl. Abb. 16) analog zum signifikanten unter Kapitel 3.3.1 geschilderten Ergebnis, dass unter genereller Immunsuppressiva-Einnahme Helios vermehrt exprimiert wurde (vgl. Abb. 15).

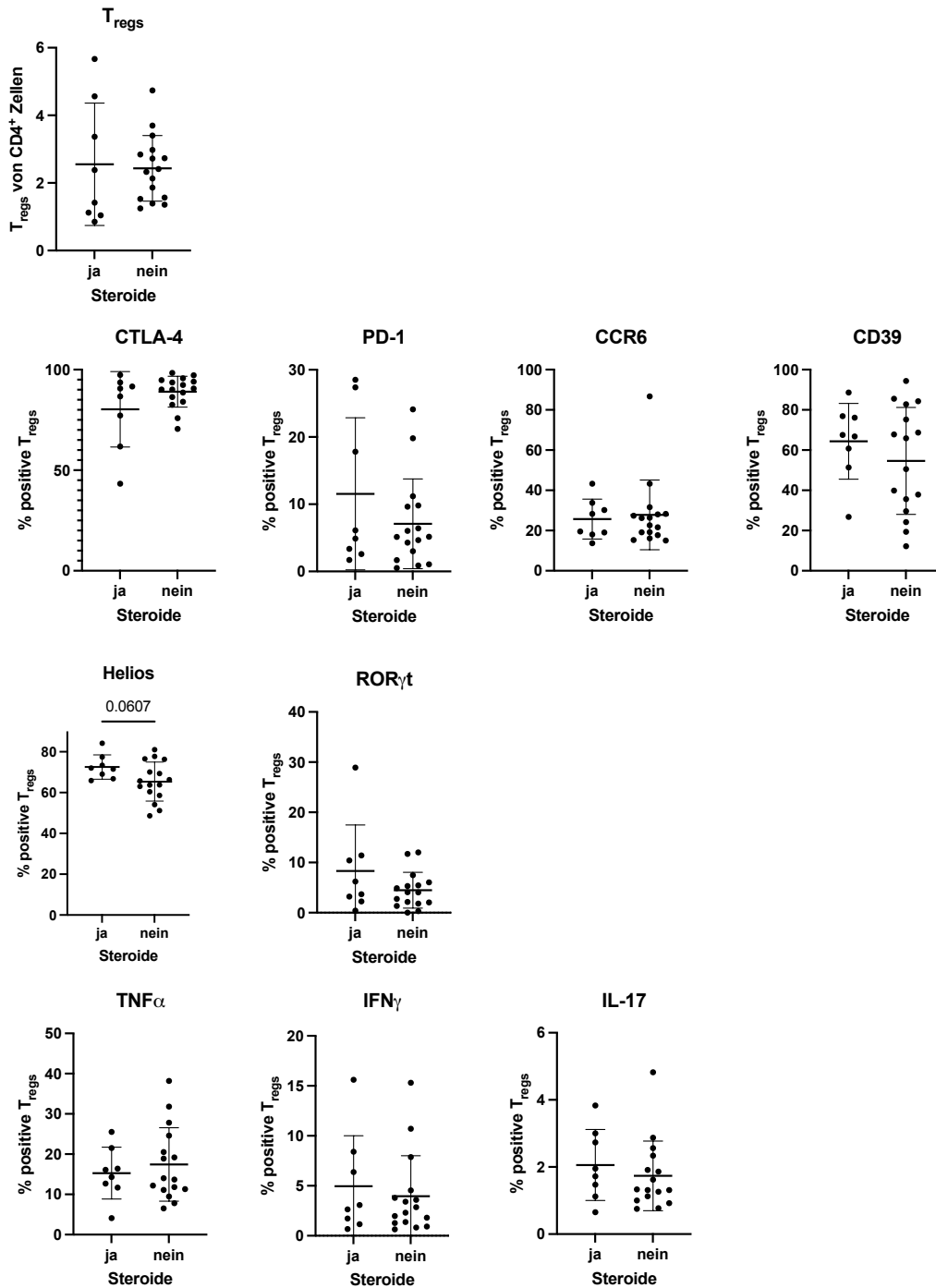


Abbildung 16: Anteil der regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) an Cluster of differentiation (CD)4⁺ Zellen sowie Expression der untersuchten Marker auf T_{regs} unterschieden nach Steroideinnahme.

Anteil der untersuchten Zellen, die ein positives Signal für den jeweiligen Marker aufweisen in Prozent. n = 24 Fälle (Remission und aktive Erkrankung).

4 Diskussion

Die Pathogenese der Autoimmunhepatitis ist noch weitgehend unverstanden. Studien diesbezüglich untersuchten unter anderem auch mögliche Veränderungen hinsichtlich Quantität, Phänotyp und Plastizität regulatorischer T-Zellen, ohne bisher einen Konsens schaffen zu können (Huang et al., 2023, Wang et al., 2020, Vuerich et al., 2021b). Es fällt auf, dass sich viele Forschungsergebnisse schon hinsichtlich der Identifizierung von T_{regs} unterscheiden, und eine methodische Heterogenität beim Vergleich von Studien berücksichtigt werden muss (Liberal et al., 2015, Peiseler et al., 2012, Huang et al., 2021).

Über eine Stimuli-abhängige Anpassung von Funktion und Phänotyp können T_{regs} eine zielgerichtete Suppression verschiedener inflammatorischer Vorgänge leisten. Unterschiedliche Unterarten von T_{regs} reagieren spezifisch je nach betroffenem Gewebe und beteiligten Effektorzellen (Delacher et al., 2017). Erzielt wird dies über epigenetische, transkriptionelle und post-transkriptionelle Veränderungen (Raffin et al., 2020). Untersuchungen konnten zeigen, dass über die Expression von T-Effektorzell-typischen Transkriptionsfaktoren, ganze funktionale Programme aktiviert werden können, die mit einer entsprechenden Expression von bestimmten Signalmolekülen, Rezeptoren und Oberflächenmolekülen einhergehen (Voo et al., 2009).

Ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Immunantworten ist wichtig, um die Entwicklung zielgerichteter Therapien für die AIH voranzutreiben. Da die Rolle der T_{regs} für die Pathophysiologie der Erkrankung bisher nicht geklärt ist, sollten sie in dieser Arbeit hinsichtlich ihres Phänotyps und möglicher Plastizität untersucht werden. Durch die Korrelation mit klinischen Verlaufsparemtern sollten Rückschlüsse auf eine mögliche Bedeutung der untersuchten, von T_{regs} exprimierten, Moleküle für die Krankheitsaktivität gezogen werden. Darüber hinaus wurde der Einfluss der medikamentösen Therapie und des Patient:innen-Alters auf die Ausprägung der untersuchten Marker evaluiert.

4.1 Hinweise für eine möglicherweise veränderte T_{reg} -Funktion zeigen sich lediglich im akuten Erkrankungsstadium der AIH

Im Vergleich der AIH-Kohorte mit einer Gesundkohorte, einer PBC- und PSC-Gruppe stellte sich dar, dass sowohl der relative Anteil regulatorischer T-Zellen an den Gesamt-T-Zellen teils signifikant erhöht war (vgl. Abb. 3A) als auch, dass einige der untersuchten Marker eine tendenziell abweichende Expression zeigten. Die Unterschiede waren lediglich in der Gruppe der Fälle mit aktiver Erkrankung und laborchemisch hoher Krankheitsaktivität zu finden was wiederum den Schluss zulässt, dass es sich um passagere Veränderungen handeln könnte.

Hinsichtlich des relativen Anteils regulatorischer T-Zellen an der Gesamt-T-Zellpopulation herrscht in der Literatur kein Konsens. Eine kürzlich veröffentlichte Metaanalyse zeigte, dass es insbesondere in Hinblick auf die verwendeten Identifizierungsmarker, sowie auch in Abhängigkeit der abgebildeten Erkrankungsaktivität zu heterogenen Ergebnissen kommt. Für die hier auch verwendete Marker-Kombination $CD4^+FoxP3^+CD25^{high}CD127^{low}$ T_{regs} / $CD4$ -Zellen zeigte sich den Autor:innen zufolge keine quantitative Abweichung. Gleiches berichteten die Forscher:innen über die Analyse der Studien, die aktive Fälle der AIH betrachteten (Huang et al., 2023). Von den 29 reviewten Studien verwendeten allerdings nur drei die berichteten Marker in Kombination mit der Betrachtung aktiver Fälle (Peiseler et al., 2012, Taubert et al., 2014, John et al., 2017).

Für $CD4^+CD25^+$ T-Zellen zeigten beispielsweise Longhi et al. (2004) einen erniedrigten Anteil bei Patienten mit aktiver autoimmuner Lebererkrankung im Vergleich zu Gesunden und Patient:innen in Remission. Die Untersuchung von Peiseler et al. (2012) fand hingegen für die Betrachtung von $CD4^+FoxP3^+CD25^{high}CD127^{low}$ T_{regs} keine signifikanten Unterschiede zwischen AIH-Erkrankten und Gesunden hinsichtlich Anzahl und suppressiver Aktivität. Mit steigender Krankheitsaktivität beobachteten sie sogar einen zunehmenden Anteil an T_{regs} . Dies entspricht der eigenen Beobachtung, dass die Fallgruppe mit der schwersten Krankheitsaktivität auch einen signifikant höheren Anteil regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut zeigte. Auch spiegelte sich dies in der eigenen Arbeit in der erfassten FoxP3 MFI wider (vgl. Abb. 3B). Die MFI, die einen Rückschluss auf die pro T_{reg} exprimierte Anzahl an FoxP3-Molekülen erlaubt, war in der Gruppe der hohen Krankheitsaktivität signifikant erhöht, was als Hinweis auf eine Hochregulation der T_{reg} -Aktivität gewertet werden könnte.

In der Studie von John et al. (2017) wurde beschrieben, dass der Anteil apoptotischer T_{regs} im Vergleich zu Gesunden sowie Fällen in Remission bei aktiver Erkrankung erhöht ist. In der Publikation findet sich keine Angabe zu den klinischen Charakteristika der untersuchten aktiven Fälle, sodass die Daten zumindest nur eingeschränkt vergleichbar mit den hier erhobenen Daten sind, in der Studie wurden jedoch dieselben Identifikationsmarker verwendet. Man könnte mutmaßen, dass bei der aktiven AIH insgesamt ein erhöhter Umsatz $CD4^+FoxP3^+CD25^{high}CD127^{low}$ T_{regs} vorliegen könnte. Dies lässt sich jedoch aus den eigens erhobenen Daten nicht weiter untersuchen, da keine Apoptosemarker bestimmt wurden.

Peiseler et al. (2012) zeigten, dass bei hoher Krankheitsaktivität auch intrahepatisch vermehrt $FoxP3^+$ Zellen vorliegen – eine Fragestellung, der in dieser Arbeit keine Rechnung getragen wird. Ob die anteilig vermehrten T_{regs} auch am Ort der Inflammation zunehmen oder ob lediglich eine lokale Umverteilung im Sinne einer verminderten Migration stattfindet, konnte im Rahmen der vorliegenden Studie nicht untersucht werden. Es muss allerdings

davon ausgegangen werden, dass die Zusammensetzung der T-Zellpopulation im peripheren Blut nicht zwangsläufig der intrahepatischen Konstellation entspricht. Zudem könnte die Menge sowohl der intrahepatischen T_{regs} als auch derer im peripheren Blut im Erkrankungsverlauf schwanken. In unbehandelten AIH-Fällen konnte eine Studie im entzündeten Lebergewebe eine Akkumulation von T_{regs} nachweisen, die unter immunsuppressiver Therapie stark rückläufig war. Dies begründete die Vermutung, dass die Abnahme der intrahepatischen T_{regs} in Zusammenhang mit den hohen Rückfallraten nach Ende einer immunsuppressiven Medikamenteneinnahme stehe (Taubert et al., 2014). Denkbar ist, dass die T_{regs} basierend auf einer noch unvollständig verstandenen Immunreaktion vermehrt im intrahepatischen Gewebe anzutreffen sind, sie jedoch im Falle AIH-Erkrankter keine ausreichende antiinflammatorische Kompetenz zeigen, um die Progression der Erkrankung einzuschränken. Wang et al. (2020) argumentierten in diesem Zusammenhang für die Chancen einer T_{reg} -basierten Therapie im Sinne eines Transfers *in-vitro*-angereicherter kompetenter T_{regs} . Bei Diabetes Typ 1 Patient:innen konnte eine Wirksamkeit dessen beobachtet werden, für die AIH wurde hingegen bisher keine Evidenz gezeigt (Marek-Trzonkowska et al., 2012, Bluestone et al., 2015).

Für die im Rahmen dieser Arbeit als Kontrollgruppen ausgewählten weiteren autoimmunen Lebererkrankungen PBC und PSC wurde kein relatives Mehr- oder Minderaufkommen von $CD4^+FoxP3^+CD25^{\text{high}}CD127^{\text{low}}$ T_{regs} im peripheren Blut beobachtet (vgl. Abb. 3A). Andere Studien fanden für die PBC eine verringerte Anzahl $CD4^+CD25^{\text{high}}$ und $CD4^+FOXP3^+$ Zellen, jedoch keine funktionellen Defizite (Lan et al., 2006, Rong et al., 2009, Bernuzzi et al., 2010, Wang et al., 2010). Bei der PSC fanden Sebode et al. (2014) im Vergleich zur PBC funktionell eingeschränkte $CD4^+FoxP3^+CD25^{\text{high}}CD127^{\text{low}}$ Zellen im peripheren Blut und eine verminderte Anzahl intrahepatischer T_{regs} .

Geht man davon aus, dass es sich bei einer im Rahmen der AIH vorliegenden T_{reg} -Funktionsstörung um ein qualitatives und nicht quantitatives Defizit handelt, so verspricht die Identifikation der entsprechend verändert vorliegenden Regulationsmechanismen einen Angriffspunkt für die Entwicklung zielgerichteter Therapien. Schaut man sich die in Kapitel 3 präsentierten Ergebnisse an, ergibt sich bezüglich der untersuchten Marker für die peripheren T_{regs} in der AIH ein recht heterogenes Bild, wie die hohe Streuung innerhalb der Patient:innen-Kohorten nahelegt. Nichtsdestotrotz ließen sich für einige Marker abweichende Tendenzen aus dem Gruppenvergleich ableiten:

Bei den untersuchten Oberflächenproteinen zeigte CTLA-4, das bereits erfolgreich als molekulares Ziel beispielsweise bei der Anti-Melanom-Therapie pharmakologisch genutzt wird, Abweichungen in der Kohorte der aktiven schweren AIH-Fälle. Dort gab es vereinzelt

Fälle mit auffällig niedriger CTLA-4 Expression, insgesamt ließ sich bei der geringen Fallzahl jedoch keine signifikant seltenere Expression nachweisen (vgl. Abb. 5A). Hinsichtlich der Frage nach der Menge pro Zelle exprimierten CTLA-4s zeigten die T_{regs} der AIH-Patient:innen unabhängig von der Krankheitsaktivität eine mit den Kontrollkohorten vergleichbare MFI und somit keinen Anhalt für eine mengenmäßige Minder- oder Mehrexpression (vgl. Abb. 5B).

CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺CTLA-4⁺ T_{regs} sind bekannt für eine starke suppressive Kapazität (Miyara et al., 2009). FoxP3 reguliert neben weiteren Faktoren die CTLA-4-Expression über die Bindung an den Promoter des CTLA-4-Gens (Marson et al., 2007). Der T_{reg}-spezifische Verlust von CTLA-4 führt bei Mäusen ähnlich wie beim scurfy Phänotyp zu Autoimmunität (Takahashi et al., 2000, Wing et al., 2008). Die Bedeutung CTLA-4s für die Funktion von T_{regs} konnte darüber hinaus auch im Menschen gezeigt werden. CTLA-4-Mutationen wurden in Zusammenhang mit dysfunktionalen FoxP3⁺ T_{regs} gebracht, die zusammen mit überaktiven Effektor-Zellen eine schwere Immundysregulation hervorriefen (Kuehn et al., 2014). Eine T_{reg}-spezifische CTLA-4 Defizienz resultiert in einer verminderten Fähigkeit zur Herabregulierung der CD80- und CD86-Expression auf APCs und damit zur beeinträchtigten Möglichkeit die über Zell-Zell-Kontakte vermittelte Kommunikation zwischen den Immunzellen zu regulieren (Wing et al., 2008). Für die AIH zeigten Okumura et al. (2008) auf mRNA-Ebene eine verminderte Expression von CTLA-4 auf CD4⁺CD25⁺ T_{regs}. Genetische Varianten im für CTLA-4 kodierenden Gen (*CTLA-4*) scheinen darüber hinaus für die Entwicklung einer Autoimmunhepatitis prädestinieren zu können. So identifizierten Agarwal et al. (2000) einen *CTLA-4*-Polymorphismus, der vermehrt im Zusammenhang mit einer ebenfalls mit der AIH in Verbindung gebrachten MHC-Variante nachgewiesen wurde. Die Autoren wiesen jedoch auch darauf hin, dass *CTLA-4* wahrscheinlich für diverse Autoimmunpathologien eine Rolle spielt, nicht nur spezifisch in der Entwicklung der AIH. Im Rahmen von Assoziationsstudien wurden weitere, die Expression von CTLA-4 betreffende genetische Varianten mit Bedeutung für die AIH identifiziert (Li et al., 2022).

Die in der Korrelationsanalyse aufgezeigten Zusammenhänge (vgl. Abb. 14) sowie die Tatsache, dass sich eine niedrigere CTLA-4 Expression der T_{regs} nur vereinzelt in der Gruppe der aktiven schweren AIH-Fälle feststellen ließ (vgl. Abb. 4), könnten ein Hinweis darauf sein, dass es sich um eine veränderliche Verminderung handelt, die mit schwerer Krankheitsaktivität ausgeprägter wird, oder aber mit deren Ausprägung die Krankheitsaktivität steigt. Wichtig erscheint generell die Unterscheidung zwischen einem Marker und einem Treiber für T_{reg}-Stabilität (Lam et al., 2022). Eine verminderte oder erhöhte Expression kann ursächlich für eine gesteigerte Stabilität beziehungsweise suppressive Aktivität sein (also als Treiber wirken), oder lediglich damit einhergehen (als Marker).

Basierend auf den erhobenen Daten ist nicht abzuleiten, ob CTLA-4 als Folge einer steigenden Krankheitsaktivität vermindert auf T_{regs} exprimiert wird oder ob eine verminderte Expression in einer gestörten suppressiven T_{reg} -Aktivität und damit zunehmenden Krankheitsaktivität resultiert. Der Nachweis genetischer Varianten, die, wie beschrieben, eine Krankheitsentwicklung begünstigen können, sowie die Tatsache, dass das Fehlen von CTLA-4 auf T_{regs} in Immunpathologien resultiert, sprechen dafür, dass es sich bei einer verminderten Expression um eine Ursache verminderter regulatorischer Aktivität handeln könnte, jedoch konnten in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Ergebnisse erhoben werden, dass dies tatsächlich für die AIH zutrifft.

Die T_{regs} der AIH-Patient:innen wiesen außerdem keine signifikant häufigere PD-1 Expression auf als die der Kontrollkohorten (vgl. Abb. 6A). Auch hinsichtlich der MFI gab es keine signifikante Abweichung für die AIH zu beobachten (vgl. Abb. 6B). Ein linearer Zusammenhang mit den erhobenen klinischen Verlaufsparemtern ließ sich ebenfalls nicht identifizieren (vgl. Abb. 14). Dies heißt nicht zwangsläufig, dass die PD-1-Expression völlig unabhängig von der Krankheitsschwere ist – prinzipiell könnte auch ein nicht-linearer Zusammenhang zugrunde liegen, der sich mit den hier gewählten statistischen Mitteln nicht nachweisen ließe.

Über PD-1 können T_{regs} APCs und Effektorzellen, insbesondere potenziell selbst-reaktive T-Zellen inhibieren und Immunreaktionen sowie Gewebeerstörung eindämmen (Keir et al., 2007). Das Fehlen von PD-1 führt dementsprechend in verschiedenen Mausmodellen zur Entwicklung von Autoimmunpathologien (Nishimura et al., 1999, Nishimura et al., 2001, Brown et al., 2003).

Darüber hinaus geht man davon aus, dass PD-1 die Entwicklung und Funktionsfähigkeit der T_{regs} selbst beeinflusst (Gianchecchi und Fierabracci, 2018). Auf der einen Seite gibt es Hinweise, dass sich PD-1 positiv auf die Stabilität von T_{regs} auswirkt. Kim et al. (2023) konnten kürzlich zeigen, dass der Knockout von PD-1 murine tumorinfiltrierende T_{regs} destabilisierte. Bei Patienten mit chronischer Hepatitis C hingegen wurde festgestellt, dass die Bindung von PD-L1 die suppressive Wirkung regulatorischer T-Zellen reduzieren kann (Franceschini et al., 2009). Lowther et al. (2016) zeigten bei Glioblastompatient:innen sowie Gesunden für T_{regs} mit hoher PD-1-Expression *in vitro* eine geringere suppressive Kapazität und gesteigerte $\text{IFN}\gamma$ -Sekretion. Die Autoren schlossen daraus, dass es sich bei der vermehrten PD-1-Expression um ein Zeichen funktioneller Erschöpfung handelt. Die im Rahmen der eigenen Studie erhobenen Daten zeigten passend zu den von Lowther et al. gewonnenen Erkenntnissen, dass eine häufigere PD-1 Expression auf den T_{regs} in Korrelation mit einer vermehrten $\text{IFN}\gamma$ Ausschüttung durch T_{regs} auftrat (vgl. Abb. 14A). Leider

lässt sich anhand der gewonnenen Daten nicht zurückverfolgen, ob es sich bei den PD-1⁺ T_{regs} auch um die IFN γ ⁺ T_{regs} handelt, da beide Marker in unterschiedlichen Panels angefärbt wurden und somit eine Ko-Expression aus den vorliegenden Daten nicht bestimmbar ist (vgl. Tab. 17 und 18). Eine gemeinsame Untersuchung beider Marker innerhalb eines angepassten Panels könnte in möglichen Folgeprojekten einen zusätzlichen Erkenntnisgewinn schaffen.

Eine Blockade von PD-1⁺ T_{regs} führte im experimentellen Setting zu einer Steigerung der T_{reg}-Proliferation und -Suppression und dadurch zu einer verminderten Anfälligkeit für Autoimmunität (Wong et al., 2013). Bei der PD-1-Blockade mittels Antikörper, wie sie in der Krebstherapie eingesetzt werden, treten jedoch auch immunvermittelte Nebenwirkungen auf, wie Hepatitiden, die wiederum Parallelen zur Autoimmunhepatitis zeigen (Curran und Sharon, 2017). Im Rahmen von malignen Krebserkrankungen einerseits und Autoimmunerkrankungen andererseits scheinen möglicherweise unterschiedliche Kontextfaktoren hinzuzukommen. Die Wirkung und Bedeutung von PD-1 in der Immunregulation ist dementsprechend komplex. Eine Mehrexpression könnte mit einer Funktionseinschränkung, wie von Lowther et al. (2016) beschrieben, einhergehen und bedeuten, dass T_{regs} in ihrer suppressiven Wirkung erschöpft sind – ihre regulative Kapazität also überschritten ist. In dieser Arbeit konnte jedoch keine signifikante Mehrexpression von PD-1 in der AIH-Gruppe nachgewiesen werden (vgl. Abb. 6).

Perry et al. (2022) beobachteten, dass die PD-1-Expression von T_{regs} eine Rolle für das Verhältnis von T_{regs} zu T_{effs} spielt. Im Rahmen einer Infektion stieg IFN γ -vermittelt auf myeloischen Zellen die Expression von PD-L1, über dessen Bindung an PD-1 die T_{reg}-Proliferation gebremst wurde. Eine negative Korrelation zwischen dem Anteil PD-1⁺ T_{regs} und der relativen T_{reg}-Anzahl konnte in der eigenen Arbeit weder für die untersuchten AIH-Patienten (vgl. Abb. 14) noch in der Gesundkohorte (Daten nicht gezeigt) gefunden werden.

Für CCR6 zeigte die durchgeführte Untersuchung Anhaltspunkte, dass eine häufigere Expression auf T_{regs} bei AIH-Patienten während der aktiven schweren Erkrankung vorliegen könnte, jedoch ließ sich dies bei n=6 je nach zugrunde gelegter Methode zum Ausschluss statistischer Ausreißer nicht signifikant nachweisen (vgl. Abb. 7A und B). Ein Einfluss von Alter (vgl. Abb. 14) oder immunsuppressiver Medikation (vgl. Abb. 15 und 16) auf die CCR6-Expression zeigte sich nicht.

CCR6 als Rezeptor für das Chemokin CCL20, vermittelt die Migration von T-Zellen, insbesondere charakteristisch für T_H17-Zellen. Die darüber ausgelöste gemeinsame Lokalisierung von T_H17-Zellen mit CCR6⁺ T_{regs} spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation

T_H17 -vermittelter Inflammation. Zur Rolle $CCR6^+$ T_{regs} bei der AIH konnten in der Literatur keine mit der hier durchgeführten Studie vergleichbaren Untersuchungen gefunden werden. Für die Colitis ulcerosa (CU) – eine chronisch entzündliche, autoimmun vermittelte Darmerkrankung – hingegen gibt es Erkenntnisse hinsichtlich des Einflusses CCR6s auf die T_{reg} -Funktion bei Erkrankten. Über die rein chemotaktische Wirkung CCR6s hinaus, zeigten Kulkarni et al. (2018) eine Bedeutung des Rezeptors bei der Differenzierung induzierter T_{regs} (iT_{reg}). iT_{regs} die sich in Anwesenheit des Liganden CCL20 differenzierten, zeigten eine geringere Ausprägung suppressiver Moleküle wie CD39, CD73 und Fas-Ligand. Ebenfalls bei Colitis ulcerosa Patient:innen wurde eine IL-17-Ausschüttung durch T_{regs} im Zusammenhang mit einer gleichzeitigen CCR6-Expression während der aktiven Krankheitsphase beobachtet. Unter Remission ging die IL-17-Konzentration hingegen zurück. Die Autor:innen führten diese Erkenntnisse auf ein bei der CU nachgewiesenes Ungleichgewicht zwischen T_{regs} und T_H17 -Zellen zurück (Long et al., 2019).

Für die PBC und PSC wurde gezeigt, dass im entzündeten Lebergewebe vermehrt CCL20 ausgeschüttet wird, durch das $CCR6^+$ T-Zellen angezogen werden und die Differenzierung zu T_H17 -Zellen angeregt wird (Oo et al., 2012, Jeffery et al., 2019). Inwiefern dies bei der AIH zutrifft und ob sich dadurch lokal auch T_H17 -like T_{regs} vermehrt differenzieren, ist nicht sicher. Man könnte erwarten, dass mit der in dieser Arbeit fraglich nachgewiesenen CCR6-Erhöhung, $ROR\gamma_t$ und IL-17 auch vermehrt messbar wären. Für $ROR\gamma_t$ konnte dies – wie im Folgenden noch diskutiert wird – bei den untersuchten Fällen schwerer AIH-Aktivität nicht eindeutig nachgewiesen werden (vgl. Abb. 10), für IL-17 geben die erhobenen Daten keinen Anhalt auf eine vorhandene Mehrexpression (vgl. Abb. 13). Auch die Korrelationsanalyse zeigte keinen signifikanten linearen Zusammenhang zwischen den Markern (vgl. Abb. 14). T_H17 -like T_{regs} befinden sich phänotypisch zwischen T_{regs} und T_H17 -Zellen und Untersuchungen deuten darauf hin, dass sie sich je nach Einfluss in beide Richtungen weiterdifferenzieren können (Du et al., 2014). Inwiefern T_H17 -like T_{regs} kontinuierlich CCR6 exprimieren und in welcher Sequenz dies passiert, also ob Chemokinrezeptoren beispielsweise erst nach Exposition gegenüber weiteren Stimuli exprimiert werden, ist nicht vollständig erforscht.

Im Gruppenvergleich zeigte sich für CD39 keine signifikant niedrigere oder höhere Expression in der AIH-Kohorte (vgl. Abb. 7). Von den untersuchten Strukturen zeigte CD39 die heterogenste Ausprägung auf den T_{regs} . Die starke Streuung konnte mit keinem der erhobenen Variablen in Verbindung gebracht werden und so stellt sich die Frage, wieso bei einigen Proband:innen weniger als ein Drittel der T_{regs} positiv für das Oberflächenprotein getestet wurden, während dieses bei anderen auf der überwiegenden Mehrzahl der T_{regs} nachgewiesen werden konnte.

Die Expression von CD39 unterliegt einer Stimuli-abhängigen Modulation, und ermöglicht eine Anpassung auf Inflammations- und Infektionszustände. Mit seiner enzymatischen Aktivität, mit der CD39 am Abbau pro-inflammatorischer Stimuli beteiligt ist, geht man davon aus, dass eine höhere Expression auf T_{regs} mit einer vermehrten Abbaukapazität einhergeht und damit die suppressive Wirkung verstärkt. Bei Mäusen, denen CD39 fehlt, konnte eine Störung der suppressiven T_{reg} -Aktivität nachgewiesen werden (Deaglio et al., 2007). Bei Patient:innen mit der autoimmunen Erkrankung Multiple Sklerose (MS) wurde eine verminderte Anzahl an $CD39^+ T_{\text{regs}}$ nachgewiesen, wodurch auf eine mögliche Bedeutung von CD39 bei der Entwicklung dieser neurodegenerativen Erkrankung geschlossen wurde (Borsellino et al., 2007). Fletcher et al. (2009) zeigten, dass sowohl $CD4^+CD25^{\text{high}}CD39^-$ als auch $CD4^+CD25^{\text{high}}CD39^+$ T-Zellen eine suppressive Wirkung auf die Proliferation und $IFN\gamma$ -Produktion von Effektorzellen haben. Die IL-17-Ausschüttung von T_H17 -Zellen hingegen konnten nur $CD39^+$ Zellen unterdrücken, während $CD4^+CD25^{\text{high}}CD39^-$ T-Zellen selbst zur IL-17 Produktion beitragen.

Bei AIH-Patienten konnten Grant et al. (2014) dysfunktionale $CD39^+ T_{\text{regs}}$ identifizieren. Die entsprechende Zellpopulation sei laut ihrer Studie sowohl quantitativ als auch in ihrer hydrolytischen Aktivität eingeschränkt. Die IL-17-Ausschüttung durch Effektorzellen könnten diese T_{regs} trotz CD39-Positivität nicht adäquat einschränken. Hingegen zeichneten sie sich durch eine höhere Expression von CD127 aus und neigten vermehrt zur $IFN\gamma$ und IL-17 Produktion – letzteres wie von Fletcher et al. (2009) beschrieben eigentlich charakteristisch für $CD4^+CD25^{\text{high}}CD39^-$ T-Zellen. Die Expression von CD127 wiederum spricht allerdings dagegen, dass es sich bei den untersuchten Zellen per definitionem um T_{regs} handelt.

Einer Untersuchung von Vuerich et al. (2021a) zufolge können die T_{regs} von AIH-Patient:innen die Expression von CD39 offenbar nicht suffizient kontextspezifisch hochregulieren. Diese Beeinträchtigung wird von den Autor:innen zur Erklärung eines Ungleichgewichts zwischen T_{regs} und T_H17 -Zellen herangezogen. Als Mechanismus dahinter beschreibt die Arbeitsgruppe weiter eine Dysfunktion des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) Signalweges. Der AhR spielt eine Rolle bei Toxin-vermittelter Inflammation und adaptiven Immunantworten und löst physiologischer Weise eine vermehrte CD39-Expression aus (Veldhoen et al., 2008, Gandhi et al., 2010). Die Beeinflussung der CD39-Expression wird als vielversprechender therapeutischer Ansatz für Immunpathologien diskutiert, ein Nutzen für die AIH-Behandlung ist auf Grundlage der Literatur vorstellbar, wurde bisher jedoch nicht demonstriert (Takenaka et al., 2016). Anders als in den aufgezeigten Publikationen finden sich in der eigenen Studie keine eindeutigen Hinweise auf eine generelle Minderexpression von CD39. Die bereits adressierte Streuung innerhalb der untersuchten Fälle deutet jedoch

auf eine eher variable Expression hin, welche in einer größeren Kohorte reevaluiert werden sollte.

Der gemessene Anteil Helios⁺ T_{regs} liegt in allen untersuchten Gruppen in dem Bereich von 70%, der in verschiedenen Studien vorbeschrieben ist (Getnet et al., 2010, Thornton et al., 2010). Hinsichtlich der Expression unterschieden sich die untersuchten T_{regs} der AIH-Patient:innen nicht signifikant von denen der anderen Gruppen (vgl. Abb. 9). Genauso wenig konnte ein Zusammenhang mit den erhobenen Verlaufsparemtern gefunden werden (Abb. 14A). Helios schien folglich eine eher stabile Expression zu zeigen und bei den T_{regs} der Erkrankten nicht grundsätzlich vermehrt oder vermindert ausgeprägt zu sein.

Es wird diskutiert, ob die Expression von Helios ein Charakteristikum von den im Thymus gebildeten tT_{regs} ist und es sich bei Helios⁻ T_{regs} hingegen um in der Peripherie erzeugte pT_{regs} handelt. Auf Mäuse scheint diese Einteilung zuzutreffen. Bei Menschen ließ sich diesbezüglich jedoch keine so eindeutige Zuordnung feststellen und die genaue Rolle von Helios in Bezug auf Plastizität und funktionelle Eigenschaften von T_{regs} bleibt unklar (Lam et al., 2022). Experimentell wurde gezeigt, dass sich Helios⁻ T_{regs} von Helios⁺ T_{regs} auf epigenetischer Ebene sowie phänotypisch hinsichtlich des TCR-Repertoires und der Zytokin-Ausschüttung unterscheiden. Funktionell stellten sich die Helios⁺ T_{regs} *in vitro* suppressiver dar, *in vivo* hingegen waren beide Populationen in der Lage eine CED in einem Mausmodell zu verhindern. In der entsprechenden Studie wiesen die Helios⁺ T_{regs} eine ausgeprägtere Demethylierung der TSDR des FoxP3-Promotors auf und ihr TCR-Repertoire war dem der Helios⁻ T_{regs} nur wenig ähnlich (Thornton et al., 2019). In einer anderen Studie von Thornton et al. (2010) gaben Helios⁻FoxP3⁺ T_{regs} als Reaktion auf eine Stimulation mit PMA/Ionomycin signifikant mehr T-Effektorzell-typische Zytokine (IL-2, IL-17, INF γ) ab als Helios⁺FoxP3⁺ T_{regs}, woraus die Autoren schlossen, dass Helios⁻ T_{regs} eine höhere Plastizität aufwiesen. Himmel et al. (2013) hingegen wiesen für Helios⁺ sowie Helios⁻ T_{regs} eine vergleichbare Demethylierung der TSDR auf – ein Hinweis für eine stabile FoxP3-Expression. Womöglich kann Helios dazu beitragen stabile T_{regs} zu identifizieren, ist jedoch nicht ursächlich für die Stabilität (Lam et al., 2022) und weder in der Literatur, noch in den eigens erhobenen Daten konnte eine Bedeutung für die AIH aufgefunden werden.

Als weiterer Transkriptionsfaktor wurde in dieser Arbeit ROR γ t erforscht. ROR γ t wurde in allen untersuchten Gruppen in einem Teil der regulatorischen T-Zellen nachgewiesen (vgl. Abb. 10). Klassischerweise exprimieren T_H17-Zellen ROR γ t und benötigen dieses wiederum für ihre Differenzierung. Man weiß aber, dass nicht alle Zellen, die den Mastertranskriptionsfaktor der T_H17-Zellen exprimieren phänotypisch auch diesem Zelltyp entsprechen. Auch T_H17-Like T_{regs} exprimieren ROR γ t. Weniger als die Hälfte der ROR γ t⁺

Zellen wiederum sezernieren pro-inflammatorisches IL-17. Ein Teil der $ROR\gamma^+$ Zellen exprimiert außerdem FoxP3, IL-10 sowie CCL20 und kann darüber regulatorisch wirken (Lochner et al., 2008). IL-23 induziert die $ROR\gamma$ Expression nicht nur in T_H17 Zellen (Langrish et al., 2005) sondern auch in T_{regs} . In diesem Zuge wird ebenfalls der Chemokinrezeptor CCR6 auf beiden Zelltypen exprimiert, wodurch sowohl Effektor- als auch regulatorische Zellen zum Ort einer Immunreaktion geleitet werden (Yang et al., 2016). Somit spielt $ROR\gamma$ eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des physiologischen immunologischen Gleichgewichts. $ROR\gamma$ -defiziente Mäuse zeigten verstärkt Autoimmunreaktionen und fehlende T_H17 -Infiltration ins Gewebe (Ivanov et al., 2006).

Regulatorische FoxP3⁺ $ROR\gamma^+$ T-Zellen haben Ähnlichkeit sowohl mit herkömmlichen T_{regs} als auch mit T_H17 -Zellen. Ihre regulatorische Rolle lässt sich auch dadurch nachvollziehen, dass sie eine Demethylierung an T_{reg} -typischen Genen aufweisen – insbesondere für FoxP3, CTLA-4, und Helios (Yang et al., 2016). Es ist unklar welchen Ursprung die $ROR\gamma^+$ T_{regs} haben – ob sie T_{regs} sind, die im Zuge einer Entzündung Charakteristika von Effektorzellen annehmen (Wohlfert und Belkaid, 2010) oder ob es sich um T_H17 -Vorläufer handelt, die über den Verlauf ihrer Entwicklung auch FoxP3 exprimieren bis schließlich der T_H17 -Phänotyp überwiegt (Zhou et al., 2008). Womöglich existieren beide Entwicklungspfade parallel.

Bei den in dieser Arbeit untersuchten AIH-Patient:innen mit schwerer Krankheitsaktivität waren im Vergleich zu den anderen Gruppen trotz einzelner Fälle mit auffällig hoher $ROR\gamma$ -Expression nicht signifikant mehr T_{regs} positiv für $ROR\gamma$ (vgl. Abb. 10). Auch zeigte sich kein linearer Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität und der $ROR\gamma$ -Expression (vgl. Abb. 14). In einer iranischen Studie mit 24 AIH-Patient:innen wurde eine insgesamt signifikant höhere Expression der Gene für $ROR\gamma$ und IL-17A gefunden. Dabei wurden allerdings PBMCs analysiert, nicht spezifisch T_{regs} (Behfarjam et al., 2019).

Man würde erwarten, dass ein größerer Anteil $ROR\gamma^+$ T_{regs} auch mit einem größeren Anteil IL-17 ausschüttender T_{regs} einhergeht. Stattdessen zeigten die erhobenen Daten diesbezüglich keinen linearen Zusammenhang (vgl. Abb. 14). Eine Analyse der Ko-Expression der Marker wurde aufgrund der insgesamt geringen Anzahl IL-17⁺ sowie $ROR\gamma^+$ T_{regs} und der daraus resultierenden nicht anzunehmenden Validität nicht durchgeführt. Hier wäre die Gewinnung einer höheren Zellzahl in möglichen Folgestudien anzustreben.

Zusätzlich zu den beschriebenen Oberflächenproteinen und Transkriptionsfaktoren untersuchte diese Arbeit auch die Ausschüttung der pro-inflammatorischen Zytokine $TNF\alpha$, $INF\gamma$ und IL-17 durch T_{regs} . Hier zeigten sich lediglich Auffälligkeiten für $INF\gamma$ (vgl. Abb. 12).

Entgegen anderen Studien, die Anzeichen einer vermehrten $\text{TNF}\alpha$ -Ausschüttung im Rahmen einer akuten Leberschädigung fanden, ließ sich dies bei den untersuchten AIH-Patient:innen in Bezug auf die T_{regs} nicht feststellen. Für Patient:innen mit akuter Hepatitis A konnten Choi et al. (2018) zeigen, dass $\text{TNF}\alpha$ -produzierende $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$ T_{regs} mit einem $T_{\text{H}}17$ -like Phänotyp mit schwerer Leberschädigung assoziiert sind. Auch in den hepatischen Infiltraten von AIH-Patient:innen wiesen Bovensiepen et al. (2019) einen erhöhten Anteil $\text{TNF}\alpha^+$ CD4^+ Zellen nach, die im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls eine erhöhte $\text{IFN}\gamma$ -Produktion aufwiesen. Die Blockade von $\text{TNF}\alpha$ mittels Antikörpern wie Infliximab wird in experimentellen Behandlungsansätzen bereits bei AIH-Patient:innen verfolgt (Bovensiepen et al., 2019). Einen wegweisenden Anteil der T_{regs} für die Ausschüttung von $\text{TNF}\alpha$ bei der AIH legen die hier gewonnenen Daten nicht nahe.

Neben $\text{TNF}\alpha$ wurden die Zytokine $\text{IFN}\gamma$ und IL-17 (letzteres wurde in Verbindung mit den Ergebnissen für $\text{ROR}\gamma\text{t}$ bereits aufgegriffen) untersucht. Insgesamt schütteten die T_{regs} der AIH-Patient:innen nicht signifikant mehr $\text{IFN}\gamma$ aus als in den Vergleichskohorten. Zu beachten ist jedoch, dass in der Gruppe mit schwerer AIH-Krankheitsaktivität einzelne Fälle mit auffällig hohem Anteil $\text{IFN}\gamma^+$ T_{regs} zu finden waren (vgl. Abb. 12). Klinische Parameter konnten mit dieser Diskrepanz innerhalb der Gruppe nicht in Bezug gebracht werden. An dieser Stelle ergibt sich weiteres Forschungspotenzial. Für eine verlässliche Aussage, ob vermehrt $\text{IFN}\gamma^+$ T_{regs} im aktiven Erkrankungsstadium der AIH vorliegen, würde sich eine Ausweitung der Untersuchung auf zusätzliche Fälle mit hoher laborchemischer Aktivität empfehlen.

$\text{IFN}\gamma$ als Typ 2 Interferon zeigt neben seiner pro-inflammatorischen Wirkung auch immunregulatorische und antiproliferative Eigenschaften und kann im Rahmen verschiedener Erkrankungen Autoimmunität entweder fördern oder entgegenwirken (De Andrea et al., 2002, Hu und Ivashkiv, 2009). Klassischerweise wird die Ausschüttung von $\text{IFN}\gamma$ mit einer $T_{\text{H}}1$ -Reaktion in Verbindung gebracht.

Bei Patient:innen mit neu aufgetretener Autoimmunhepatitis nach Transplantation fanden Arterbery et al. (2016) eine erhöhte Anzahl $\text{IFN}\gamma$ und IL-17 produzierender T_{regs} . Diese T_{regs} waren funktionell eingeschränkt, unabhängig vom Demethylierungsstatus des FoxP3-Locus. Zurückzuführen war die Aktivierung der proinflammatorischen T_{regs} auf von Monozyten produziertes IL-12 und IL-6, das jeweils für die T_{reg} -Differenzierung hin zu $T_{\text{H}}1$ - beziehungsweise $T_{\text{H}}17$ -like T_{regs} verantwortlich gemacht wurde. Durch eine Blockade von $\text{IFN}\gamma$ hingegen konnten die T_{regs} ihre Funktion teilweise wiedererlangen.

In dieser Arbeit konnte im Gegensatz zu der geschilderten Veröffentlichung keine eindeutig vermehrte Anzahl $\text{IFN}\gamma^+$ T_{regs} bei aktiver schwerer AIH-Erkrankung nachgewiesen werden. Sollte sich in potenziell weiteren Untersuchungen ein höherer Anteil $\text{IFN}\gamma^+$ T_{regs} nachweisen lassen, so könnte es sich mutmaßlich um $\text{T}_{\text{H}}1$ -like T_{regs} handeln. Dann wäre ebenfalls eine Expression von T-bet zu erwarten, die bisher nicht erhoben wurde. Dies könnte ein potenziell interessanter Marker für weitere Untersuchungen sein. Ebenso könnte man in einer weiteren Erhebung die Ko-Expression von $\text{IFN}\gamma$ und PD-1 beleuchten, für die sich, wie bereits geschildert, Hinweise auf eine zusammenhängende Expression in der Korrelationsanalyse zeigten (vgl. Abb. 14).

Eine Mehrsekretion von IL-17 ließ sich nicht darstellen. Über alle Gruppen hinweg schütteten die T_{regs} vergleichbar häufig IL-17 aus (vgl. Abb. 13). Nur sehr wenige T_{regs} wiesen dabei ein positives IL-17-Signal auf und die Korrelationsanalyse fand Hinweise darauf, dass eine zunehmende Krankheitsaktivität in der untersuchten AIH-Kohorte eher mit einer geringeren IL-17 Expression einherging. Dies steht im Kontrast zu Beobachtungen, die bei der Colitis ulcerosa gemacht wurden: Im aktiven Krankheitsgeschehen wurde CCR6 gemeinsam mit IL-17 vermehrt von T_{regs} exprimiert und die CCR6^+ T_{regs} zeigten eine stärkere Sekretion des Zytokins. Im Remissionsstadium wiederum waren diese Effekte rückläufig (Long et al., 2020).

Eine Expression von IL-17 durch T_{regs} spricht im Allgemeinen für einen $\text{T}_{\text{H}}17$ -like Phänotyp. Dieser wiederum wurde im Rahmen inflammatorischer Prozesse mit einer verminderten suppressiven Funktion der T_{regs} in Verbindung gebracht (Beriou et al., 2009, Komatsu et al., 2014, Zhu et al., 2019). Im Mausmodell konnte für die entzündete Leber ein vermehrtes Vorkommen intrahepatischer autoreaktiver $\text{T}_{\text{H}}17$ -like T_{regs} demonstriert werden (Preti et al., 2021). Dies spiegelt sich in den hier untersuchten humanen T_{regs} nicht wider und könnte auf den Ursprung der gewonnenen Zellen aus dem peripheren Blut zurückzuführen sein. Möglicherweise migrieren ebendiese IL-17^+ und potenziell auch CCR6^+ T_{regs} im Rahmen der akuten Inflammation in die Leber und könnten dann als Folge dessen im peripheren Blut nur noch vermindert nachweisbar sein.

Zhao et al. (2011) wiesen neben einem erhöhtem Serum-IL-17 bei AIH-Patient:innen eine vermehrte Anzahl IL-17^+ intrahepatischer Zellen nach. Sie zeigten darüber hinaus unter anderem eine vermehrte hepatische Expression von IL-17, $\text{ROR}\gamma\text{t}$, IL-23 und IL-6. Über Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) induziert IL-17 die IL-6 Expression, die wiederum $\text{T}_{\text{H}}17$ Zellen im Sinne eines positiven Feedbacks stimuliert. Man geht davon aus, dass IL-6 entscheidend zur Differenzierung von konventionellen T_{regs} hin zu $\text{T}_{\text{H}}17$ -like T_{regs} beiträgt (Qiu et al., 2020).

Es wird deutlich, dass intrahepatisch in Bezug auf IL-17 und T_H17-assoziierte Zytokine ein spezielles Milieu herrscht, das sich vom peripheren Blut unterscheidet und dementsprechend ein Schluss von intrahepatischen T_{regs} auf solche im peripheren Blut und umgekehrt nur bedingt möglich ist.

4.2 Ein Einfluss einer medikamentösen Immunsuppression auf die Expression konnte für den Großteil der untersuchten T_{reg}-Marker nicht beobachtet werden

Bekanntermaßen können Immunsuppressiva die Zellproliferation, Expression molekularer Strukturen und Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine beeinflussen (Furukawa et al., 2016). Nur wenige der untersuchten AIH-Patient:innen nahmen zum Erhebungszeitpunkt gar keine pharmakologische Therapie ein. Es ist möglich, dass die Einnahme von Immunsuppressiva eventuell bestehende Unterschiede hinsichtlich veränderter T_{reg}-Marker zwischen Erkrankten und Gesunden ausgeglichen beziehungsweise kaschiert haben könnte. Dabei muss man davon ausgehen, dass potenziell steroidale sowie nicht-steroidale immunsuppressive Medikamente die Ergebnisse beeinflusst haben könnten.

Bei den Patient:innen, die eine immunsuppressive Therapie unabhängig vom verwendeten Medikament einnahmen, zeigte sich eine signifikante Abweichung lediglich für die Häufigkeit Helios⁺ T_{regs} (vgl. Abb. 15). Unter Immunsuppression exprimierten signifikant mehr T_{regs} den Transkriptionsfaktor Helios ($p = 0,0094$). Es ist dementsprechend nicht auszuschließen, dass die Immunsuppressiva hier eine Störvariable darstellen und dass bei der AIH ohne medikamentöse Behandlung tatsächlich weniger der T_{regs} Helios exprimieren würden.

Tendenzen für einen Einfluss der Immunsuppression zeigten sich auch für die Expression von IL-17 ($p = 0,0542$) sowie für den relative Anteil der T_{regs} ($p = 0,1192$) an den CD4⁺ Zellen (vgl. Abb. 15).

Der Einfluss regelmäßig bei der AIH-Behandlung eingesetzter Immunsuppressiva – unter anderem 6-Mercaptopurin und MMF – auf CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurde in einer Studie von Grant et al. (2017) untersucht. Die untersuchten Zellen exprimierten *in vitro* nach Stimulation unter Immunsuppressiva-Einfluss insbesondere weniger IFN γ . Auch für die T_{reg}-spezifische IFN γ -Expression gibt es in der Literatur Hinweise auf einen medikamentösen Einfluss: *In vitro* wirkte sich der Zusatz von Cyclosporin und 6a-Methylprednisolon sowie hochdosiertem Azathioprin und MMF negativ auf die Anzahl IFN γ ⁺ T_{regs} aus. Niedrige Azathioprin and MMF-Dosierungen hingegen steigerten die IFN γ -Expression der T_{regs} (Daniel et al., 2016).

Insbesondere Kortikosteroide wirken sehr potent und breit. Ein Ansprechen auf Steroidgabe stützt den Verdacht auf eine autoimmune Genese einer Hepatitis (Alvarez et al., 1999). Im

Rahmen dieser Arbeit wurde daher auch untersucht, ob sich die Daten der Patient:innen, die zum Zeitpunkt der Probenentnahme Steroide in Form von Prednisolon oder Budesonid einnahmen, von denen unterschieden, die keine Steroide erhielten. Hinsichtlich keiner der untersuchten Marker konnte unter Steroideinnahme im erhobenen Datensatz eine signifikant höhere oder niedrigere Expression auf T_{regs} festgestellt werden (vgl. Abb. 16). Auch der relative Anteil der T_{regs} an den $CD4^+$ Zellen war in beiden Gruppen vergleichbar hoch. In der Literatur finden sich Daten, die eine Zunahme der T_{regs} unter Steroidgabe zeigen, jedoch sind diese nur eingeschränkt vergleichbar, da Patient:innen mit SLE betrachtet wurden und die Bestimmung der T_{regs} lediglich auf dem Nachweis von CD4 und CD25 basierte (Suárez et al., 2006).

Eine gewisse Verfälschung der Daten durch die Einnahme immunsuppressiver Medikamente lässt sich letztlich mit dem gewählten Studiendesign nicht gänzlich ausschließen.

4.3 Limitationen

Aufgrund der oftmals protrahierten Diagnosestellung, des Therapiedrucks bei akutem Krankheitsbild und des variablen Verlaufs, stellte es sich als schwierig heraus, Patient:innen im Akutstadium der AIH für die Untersuchung zu rekrutieren. So ist die Fallzahl insbesondere der akuten schweren Fälle mit $n = 6$ relativ klein. Auch war ein Großteil der Fälle (18 von 24 Patient:innen) bereits initial mit Immunsuppressiva antherapiert. Zwar wurde der Einfluss einer Medikamenteneinnahme untersucht und es ließ sich dafür mit Ausnahme von Helios kein signifikanter Anhalt finden, trotzdem kann wie zuvor beschrieben im angewandten Studiendesign ein Einfluss durch eine im Rahmen der Rekrutierung nicht vermeidbare Vormedikation der Patienten auf die erhobenen Parameter nicht ausgeschlossen werden. Um die Wirkung von Krankheitsaktivität und Therapie auf die Ausprägung der untersuchten Marker besser abschätzen zu können, wäre eine longitudinale Untersuchung mit mehrmaliger Probengewinnung und intraindividuellem Vergleich von aktiver Erkrankung zu Remission beziehungsweise vor und nach Therapie wünschenswert.

Zudem stellt die Unterteilung der AIH-Gruppe in die Subgruppen Remission, moderate und schwere Krankheitsaktivität eine nicht validierte Einteilung dar. Auch wenn die zur Abgrenzung verwendeten Werte eine wichtige Rolle für die Diagnosestellung und Überprüfung des Therapieerfolges darstellen, kann nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass anhand dieser Parameter die Krankheitsschwere eindeutig abgegrenzt werden kann.

In dieser Arbeit wurde die Expression von Strukturen auf T_{regs} überprüft, für die zuvor eine mögliche funktionelle Bedeutung identifiziert worden war. Aufgrund technischer

Voraussetzungen konnte nur eine begrenzte Anzahl an Markern durchflusszytometrisch gemessen werden und so stellen die erhobenen phänotypischen Merkmale nur einen kleinen Ausschnitt der zahlreichen in und auf T_{regs} exprimierten Rezeptoren, Enzyme, Transkriptionsfaktoren und Zytokine dar. So wurden beispielsweise keine der für T_{regs} typischen anti-inflammatorischen Zytokine wie IL-10, IL-35 oder TGF β gemessen, deren Expression im Verhältnis zu den pro-inflammatorischen Zytokinen interessant gewesen wäre.

Einige der Marker werden grundsätzlich lediglich von wenigen T_{regs} exprimiert. Hinzu kommt, dass T_{regs} bekanntermaßen nur einen Anteil von 5-10% an den Gesamt-CD4⁺ T-Lymphozyten ausmachen. Trotz vollständiger durchflusszytometrischer Erfassung des Probenvolumens, war eine valide Untersuchung der Co-Expression mehrerer Marker nur bedingt möglich.

Offen bleibt zudem die Frage, inwiefern die intrahepatischen T_{regs} die gleichen Charakteristika zeigen, wie die untersuchten peripher gewonnenen T_{regs} . Bei einer organspezifischen Erkrankung wie der AIH kann davon ausgegangen werden, dass lokale Faktoren zumindest teilweise die Manifestation in der Leber bedingen und dass die T_{regs} intrahepatisch wiederum im inflammatorischen Umfeld anderen Stimuli ausgesetzt sind als während der Zirkulation im peripheren Blut. Die durchgeführte *in-vitro*-Stimulation mittels PMA/Ionomycin kann dies sicherlich nur sehr bedingt abbilden.

Hinsichtlich der statistischen Auswertung ist zu beachten, dass eine fehlende Korrelation im Pearson-Test anzeigt, dass sich auf Grundlage der betrachteten Daten kein linearer Zusammenhang zwischen den untersuchten Variablen nachweisen ließ. Dies schließt aber einen exponentiellen oder quadratischen Zusammenhang nicht aus. Zudem bedeutet selbst eine starke Korrelation nicht zwangsläufig, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen den Variablen besteht und kann nicht anzeigen, welche Variable die jeweils abhängige und unabhängige ist – also was Folge und was Ursache ist.

4.4 Ausblick

Für die AIH wurden in den letzten Jahren viele Untersuchungen bezüglich der zugrundeliegenden Faktoren und Pathomechanismen durchgeführt. Bei bestehender Heterogenität von Methoden und Patient:innen kommt es auch zu heterogenen Ergebnissen und Fragen hinsichtlich der Ätiologie und optimalen zielgerichteten Therapien bleiben weiterhin offen. Es ist denkbar, dass es sich bei der AIH um einen Symptomkomplex handelt, dem verschiedene pathologische Veränderungen zugrunde liegen, die letztlich in einem lokalen Ungleichgewicht zwischen Abwehr und Toleranz resultieren.

Als ein grundlegender Mechanismus der Immunregulation wird eine Rolle der T_{regs} sowohl für die Manifestation der AIH als auch als Ziel medikamentöser Behandlungsansätze diskutiert. Auf Grundlage identifizierter molekularer Angriffspunkte wurden verschiedene T_{reg} -basierte pharmakologische Ansätze entwickelt, die sich teilweise bereits in klinischer Testung befinden. Das zugrundeliegende Prinzip ist dabei, den T_{reg} -Pool so zu beeinflussen, dass die vorhandenen T_{regs} eine stabile suppressive Wirkung auf Effektorzellen (wieder-)erlangen ohne selbst Effektor-Funktionen auszuüben (Vuerich et al., 2021b). Darüber soll das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Prozessen wiederhergestellt werden. Studien evaluieren die Gabe *ex vivo* generierter und modifizierter T_{reg} -Konzentrate (Raffin et al., 2020). Konzentrierte T_{reg} -Infusionen sollen ersten Ergebnissen zufolge sicher in der Anwendung und in der Lage sind, in die Leber zu migrieren um dort ihre Wirkung zu erfüllen. Bei einer kleinen Serie von AIH-Patient:innen konnten die verabreichten T_{regs} T-Effektorzellen supprimieren und dadurch die Leberschädigung begrenzen (Oo et al., 2019).

Eine weitere in der klinischen Testung befindliche Therapieoption könnte die *in vivo* Expansion regulatorischer T-Zellen durch niedrig dosiertes IL-2 sein. Mit ihrem durch CD25 hoch-affinen IL-2-Rezeptor reagieren T_{regs} sehr empfindlich auf IL-2 und benötigen dieses, um einer frühzeitigen Apoptose zu entgehen. In der Leber sind die IL-2 Spiegel gering, wodurch Überleben und Proliferation erschwert werden (Chen et al., 2016). Im Mausmodell konnte durch IL-2 ein Gleichgewicht zwischen Effektor-T-Zellen und T_{regs} wiederhergestellt werden (Buitrago-Molina et al., 2021) und die Gabe von IL-2 erhöhte in Mäusen die Anzahl intrahepatischer T_{regs} und auch deren Expression von Markern wie CD39 (Kurt et al., 2022). Ergebnisse aus der klinischen Anwendung im Rahmen einer unkontrollierten Studie, in der auch zwei AIH-Patient:innen behandelt wurden, zeigten eine wirkungsvolle T_{reg} -Expansion (Rosenzweig et al., 2019). Die Schwierigkeit regulatorische T-Zellen mit verlässlich suppressiver Aktivität sicher zu identifizieren, zu isolieren und stabilisieren machte die therapeutische Anwendung bisher schwierig. Ein entzündliches Milieu fördert die Differenzierung von T_{regs} zu T_{H} -Effektorzellen, weshalb bei der Isolation und therapeutischen Anwendung von T_{regs} perspektivisch darauf geachtet werden muss, dass möglichst wenig T_{H} -like T_{regs} mitverabreicht werden, da diese ohnehin schon instabiler sind und im aktiven Krankheitsgeschehen potenziell in eine nicht gewünschte T_{H} -Wirkweise umschlagen können (Richardson et al., 2022). Dementsprechend ist es wichtig, weiter daran zu arbeiten, Marker zu finden anhand derer man jeweils stabile suppressive sowie labile nicht-suppressive T_{regs} unterscheiden kann.

Die vorliegende Arbeit konnte kein quantitatives T_{reg} -Defizit im peripheren Blut der AIH-Patient:innen identifizieren. Im Gegenteil war der relative Anteil der T_{regs} an den T-Zellen im aktiven Erkrankungsstadium eher erhöht. Die simultane Gewinnung von zusätzlichem

Untersuchungsmaterial in Form von Lebergewebe von Gesunden sowie Erkrankten ergänzend zu den bisher untersuchten Blutproben könnte die Frage klären, ob sich im Leberparenchym ebenfalls vermehrt T_{regs} befinden oder der Anteil der T_{regs} zwar in der aktiven Erkrankung hochreguliert wird, diese jedoch nicht erfolgreich in die Leber migrieren. Die Nutzung immunhistologischer Verfahren zur Darstellung der T_{regs} innerhalb des Lebergewebes könnte zusätzliche Informationen über die lokale Verteilung der Zellen, die räumliche Nähe sowie das relative Verhältnis zu anderen Immunzellen liefern.

Auch inwiefern die T_{regs} qualitativ uneingeschränkt wirken können, insbesondere in der Leber, sollte weiter untersucht werden. Anhand der erhobenen Daten zeigte sich keine signifikante Abweichung der Expression der untersuchten Marker auf den T_{regs} von AIH-Patient:innen im Vergleich zu den gewählten Referenzkohorten. Um weitere aussagekräftige Erkenntnisse zu gewinnen, ob tatsächlich kein grundlegendes oder passageres Funktionsdefizit der T_{regs} bei der AIH besteht, sind zusätzliche Untersuchungen notwendig. Prinzipiell kommen selbstverständlich weitere Marker für eine Untersuchung in Frage, beispielsweise der T_{H1} -typische Transkriptionsfaktor T-bet, Apoptose-induzierende Proteine wie Granzym B und Perforin, anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 oder weitere Oberflächenproteine wie Glucocorticoid-Induced TNFR-Related Protein (GITR), Glycoprotein A repetitions predominant (GARP) oder Neuropilin-1, um nur ausschnittsweise Strukturen zu nennen, die in einem Zusammenhang mit der T_{reg} -Funktion identifiziert wurden (Asseman et al., 1999, Grossman et al., 2004, Cao et al., 2007, Delgoffe et al., 2013, Petrillo et al., 2015, Sun et al., 2016).

Die Nutzung zusätzlicher Methodik wie etwa Transkriptom- und Proteomanalysen zur gleichzeitigen Messung mehrerer Marker stellt darüber hinaus eine Möglichkeit zur besseren Untersuchung der Co-Expression von Strukturen dar, für die sich eine abhängige oder sogar synergistische Ausprägung beziehungsweise Wirkung vermuten lässt, beispielsweise für PD-1 und $\text{IFN}\gamma$. Zudem könnte auch hier die qualitative Analyse intrahepatischer T_{regs} Rückschlüsse auf lokale Mikromilieu-abhängige Veränderungen erlauben, die sich durch eine Betrachtung rein im peripheren Blut gewonnener T_{regs} nicht abschätzen lassen.

Zusätzlich sollte eine höhere Fallzahl Therapie-naiver Patient:innen sowie insbesondere solcher im aktiven akuten Stadium der AIH erzielt werden. Optimalerweise würde eine wiederholte Testung intrahepatischer sowie zirkulierender T_{regs} zum Zeitpunkt der aktiven Erkrankung – wenn möglich vor Therapieinitiierung –, unter Therapie und bei erreichter Remission erfolgen.

5 Zusammenfassung

Die Autoimmunhepatitis (AIH) stellt eine chronische und häufig schwer verlaufende Erkrankung ungeklärter Ursache dar, deren Behandlung langwierig und mit hohen Rückfallraten verbunden ist. Pathophysiologisch wird eine funktionelle Störung regulatorischer T-Zellen (T_{regs}) kontrovers diskutiert. Diese sind im gesunden Organismus für die Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts zwischen Immunabwehr und Toleranz zuständig. Es ist bekannt, dass T_{regs} eine gewisse Plastizität aufweisen, also ihr Phänotyp und ihre Funktion durch Stimuli beeinflussbar sind, bis hin zu dem An- und Abschalten ganzer Programme assoziierter Transkriptionsfaktoren, Oberflächenrezeptoren und Zytokine.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Oberflächenmarker (CTLA-4, PD-1, CD39, CCR6), Transkriptionsfaktoren (FoxP3, Helios, ROR γ t) und Zytokine (TNF α , INF γ , IL-17) untersucht, deren Expression entweder mit klassischen suppressiven Funktionsmechanismen von T_{regs} verbunden wird oder auf einen abweichenden Phänotyp hindeuten kann. Mittels Durchflusszytometrie wurden die T_{regs} von 24 AIH-Erkrankten sowie 34 Kontrollpersonen (20 Gesunden, 7 PSC- und 7 PBC-Erkrankten) auf die Expression der genannten Moleküle untersucht. Zusätzlich wurde die *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) für FoxP3, CTLA-4 und PD-1 untersucht. Eine Korrelationsanalyse und ein Subgruppenvergleich hinsichtlich der Einnahme immunsupprimierender Medikamente überprüfte darüber hinaus den Einfluss klinischer Parameter auf die Expression der Marker.

Im Gruppenvergleich ließen sich lediglich für die akut AIH-Erkrankten, jedoch nicht für die Fälle in Remission Auffälligkeiten erkennen. 6 Fälle wiesen eine schwere Krankheitsaktivität auf und zeigten darunter im peripheren Blut eine signifikante relative Vermehrung der T_{regs} sowie eine erhöhte FoxP3 MFI. Für die weiteren untersuchten Marker konnte keine signifikant abweichende Expressionshäufigkeit festgestellt werden. Als signifikanter Einflussfaktor auf die Expression des Transkriptionsfaktors Helios konnte die Einnahme immunsupprimierender Medikamente identifiziert werden.

Die Ergebnisse legen nahe, dass im akuten Krankheitsgeschehen der AIH Veränderungen auftreten, unter denen im peripheren Blut der T_{reg} -Anteil an den T-Lymphozyten steigt. Inwiefern dies einer lokalen Umverteilung oder einer zunehmenden T_{reg} -Differenzierung entspricht bleibt unklar. Für phänotypisch signifikante Veränderungen hinsichtlich der untersuchten Marker ließ sich kein Anhalt finden. Zur Validierung dessen sollten weiterführende Untersuchungen insbesondere akute Krankheitsfälle rekrutieren.

Summary

Autoimmune hepatitis (AIH) is a chronic, often severe disease of unknown cause. Its treatment is complex and associated with high relapse rates. Dysfunction of regulatory T cells (T_{regs}) is controversially discussed as a possible factor in the pathogenesis of this disease. T_{regs} are responsible for maintaining a balance between immune defense and tolerance. It is known that T_{regs} exhibit a certain plasticity, meaning their phenotype and function can be influenced by stimuli, up to switching on and off whole programs of associated transcription factors, surface receptors and cytokines.

In this work, surface markers (CTLA-4, PD-1, CD39, CCR6), transcription factors (FoxP3, Helios, ROR γ t) and cytokines (TNF α , IFN γ , IL-17) have been investigated, whose expression is either associated with classical suppressive mechanisms of T_{regs} or might indicate an aberrant phenotype. By flow cytometry, T_{regs} from 24 AIH patients as well as from 34 control subjects (20 healthy, 7 PSC and 7 PBC patients) were analyzed for the molecules mentioned above. Also, the *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) for FoxP3, CTLA-4 und PD-1 was explored. Correlation analysis and subgroup comparison investigated the influence of clinical aspects as well as immunosuppressive drugs on expression levels.

Group comparison showed that significant changes were detected only in the cases actively suffering from AIH, but not in the cases in remission. Six cases were found to have severe disease activity and displayed a significant relative increase of T_{regs} in peripheral blood as well as elevated FoxP3 MFI. For the other markers, no significantly different expression could be demonstrated. However, taking immunosuppressive drugs was identified as a significant influencing factor on the expression of the transcription factor Helios.

The results indicate that in acute AIH changes occur, that lead to an increased T_{reg} proportion in the peripheral blood. Whether this corresponds to a local redistribution or an increase in T_{reg} differentiation remains unclear. No evidence was found for phenotypically significant changes regarding the markers examined. To validate this, further studies should recruit particularly acute AIH cases.

6 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AIH	Autoimmunhepatitis
ALAT	Alanin-Aminotransferase
ANA	Antinukleäre Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
CCL	Chemokin-Ligand
CCR	Chemokin-Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
FoxP3	Forkhead box protein 3
g	Gramm
GARP	Glycoprotein A repetitions predominant
GITR	Glucocorticoid-induced TNFR-related Protein
IAIHG	International Autoimmune Hepatitis Group
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPEX	X-chromosomale Immundysregulation, Polyendokrinopathie und Enteropathie
KC	Kupfferzellen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LKM	Liver-kidney-microsome
LSEC	Leber-Sinusendothelzellen
<i>M</i>	Mittelwert (arithmetisches Mittel)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mg	Milligramm
mHAI	Modified Hepatic Activity Index
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
ml	Milliliter
mM	Millimol
MMF	Mycophenolat Mofetil

MS	Multiple Sklerose
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NTPDase 1	Ectonucleosidtriphosphat diphosphohydrolase 1
<i>p</i>	p-Wert (Signifikanzwert)
PacO	Pacific Orange
PBC	Primär biliäre Cholangitis
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PD-1	Programmed cell death protein 1
PE	Phycoerythrin
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
<i>r</i>	Korrelationskoeffizient
ROR γ t	Retinoic-acid-receptor-related orphan receptor gamma t
SLA	Soluble liver antigen
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SMA	Smooth-muscle antibody
Tab.	Tabelle
TACE	TNF α -converting enzyme
TCR	T-Zell Rezeptor
T _{eff}	Effektor-T-Zellen
TGF β	Transforming growth factor beta
T _H	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	TNF α -Rezeptor
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle
TSDR	T _{reg} -spezifische demethylierte Region
U	Einheit
UDCA	Ursodesoxycholsäure
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
vgl.	Vergleiche
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung als Maßeinheit des Zentrifugierens
γ GT	Gamma-Glutamyltransferase
μ l	Mikroliter

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Diagnostische Kriterien der International Autoimmune Hepatitis Group. 21

Tabelle 2: Geräte 25

Tabelle 3: Verbrauchsutensilien 25

Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien 26

Tabelle 5: Antikörper..... 26

Tabelle 6: Kits 27

Tabelle 7: Software..... 27

Tabelle 8: Zell-Kulturmedium 28

Tabelle 9: Einfache phosphatgepufferte Salzlösung (1x PBS), pH 7,4 28

Tabelle 10: Untersuchungsgruppen nach Krankheitsbildern. 29

Tabelle 11: Einteilung der AIH-Kohorte nach Krankheitsaktivität. 30

Tabelle 12: Übersicht aktiver AIH-Fälle. 31

**Tabelle 13: Gruppencharakteristika unterschieden nach Einnahme
immunsupprimierender Medikation. 32**

**Tabelle 14: Übersicht AIH-Fälle ohne Einnahme einer immunsupprimierenden
Medikation..... 33**

Tabelle 15: Gruppencharakteristika unterschieden nach Steroideinnahme. 33

Tabelle 16: Mastermix Stimulation. 34

Tabelle 17: Antikörper für die extrazelluläre Färbung 36

Tabelle 18: Antikörper für die intrazelluläre Färbung..... 37

**Tabelle 19: Auszug linearer Zusammenhänge zwischen den untersuchten Markern
exprimiert von T_{regs} und klinischen Parametern. 56**

**Tabelle 20: Auszug linearer Zusammenhänge zwischen den untersuchten Markern
sowie klinischen Parametern und dem Patient:innenalter..... 57**

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Exemplarische Darstellung regulatorischer Mechanismen einer T_{reg}	9
Abbildung 2: Gating-Strategie zur Identifizierung der T_{regs}	39
Abbildung 3: Relativer Anteil regulatorischer T-Zellen (T_{regs}) an den $CD4^+$ T-Zellen und FoxP3 Expression der T_{regs}	42
Abbildung 4: Relativer Anteil regulatorischer T-Zellen (T_{regs}) und $CD4^+$ Zellen an allen $CD45^+$ Lymphozyten.....	43
Abbildung 5: CTLA-4 Expression der regulatorischen T-Zellen (T_{regs}).	44
Abbildung 6: PD-1 Expression der regulatorischen T-Zellen (T_{regs}).	45
Abbildung 7: CCR6 Expression der regulatorischen T-Zellen (T_{regs}).	46
Abbildung 8: CD39 Expression der regulatorischen T-Zellen (T_{regs}).	47
Abbildung 9: Helios Expression der regulatorischen T-Zellen (T_{regs}).	48
Abbildung 10: ROR γ t Expression der regulatorischen T-Zellen (T_{regs}).	49
Abbildung 11: TNF α Expression der regulatorischen T-Zellen (T_{regs}).	50
Abbildung 12: IFN γ Expression der regulatorischen T-Zellen (T_{regs}).	51
Abbildung 13: IL-17-Expression der regulatorischen T-Zellen (T_{regs}).	52
Abbildung 14: Zusammenhang zwischen ausgewählten klinischen Verlaufsparemtern und Expression der erhobenen Marker auf regulatorischen T-Zellen (T_{regs}).	55
Abbildung 15: Anteil der regulatorischen T-Zellen (T_{regs}) an Cluster of differentiation (CD) 4^+ Zellen sowie Expression der untersuchten Marker auf T_{regs} unterschieden nach Einnahme immunsupprimierender Medikamente.	58
Abbildung 16: Anteil der regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) an Cluster of differentiation (CD) 4^+ Zellen sowie Expression der untersuchten Marker auf T_{regs} unterschieden nach Steroideinnahme.	60

9 Literaturverzeichnis

- ADAMS, D. H. & LLOYD, A. R. 1997. Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet*, 349, 490-5.
- AFKARIAN, M., SEDY, J. R., YANG, J., JACOBSON, N. G., CEREB, N., YANG, S. Y., MURPHY, T. L. & MURPHY, K. M. 2002. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4⁺ T cells. *Nat Immunol*, 3, 549-57.
- AGARWAL, K., CZAJA, A. J., JONES, D. E. & DONALDSON, P. T. 2000. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphisms and susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology*, 31, 49-53.
- ALVAREZ, F., BERG, P. A., BIANCHI, F. B., BIANCHI, L., BURROUGHS, A. K., CASCADO, E. L., CHAPMAN, R. W., COOKSLEY, W. G. E., CZAJA, A. J., DESMET, V. J., DONALDSON, P. T., EDDLESTON, A. L. W. F., FAINBOIM, L., HEATHCOTE, J., HOMBERG, J. C., HOOFNAGLE, J. H., KAKUMU, S., KRAWITT, E. L., MACKAY, I. R., MACSWEEN, R. N. M., MADDREY, W. C., MANNS, M. P., MCFARLANE, I. G., MEYER ZUM BÜSCHENFELDE, K. H., MIELI-VERGANI, G., NAKANUMA, Y., NISHIOKA, M., PENNER, E., PORTA, G., PORTMANN, B. C., REED, W. D., RODES, J., SCHALM, S. W., SCHEUER, P. J., SCHRUMPF, E., SEKI, T., TODA, G., TSUJI, T., TYGSTRUP, N., VERGANI, D. & ZENIYA, M. 1999. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *Journal of Hepatology*, 31, 929-938.
- ANAYA, J. M., RESTREPO-JIMÉNEZ, P. & RAMÍREZ-SANTANA, C. 2018. The autoimmune ecology: an update. *Curr Opin Rheumatol*, 30, 350-360.
- ARTERBERY, A. S., OSAFO-ADDO, A., AVITZUR, Y., CIARLEGLIO, M., DENG, Y., LOBRITTO, S. J., MARTINEZ, M., HAFLER, D. A., KLEINWIETFIELD, M. & EKONG, U. D. 2016. Production of Proinflammatory Cytokines by Monocytes in Liver-Transplanted Recipients with De Novo Autoimmune Hepatitis Is Enhanced and Induces T_H1-like Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, 196, 4040-4051.
- ASANO, M., TODA, M., SAKAGUCHI, N. & SAKAGUCHI, S. 1996. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med*, 184, 387-96.
- ASSEMAN, C., MAUZE, S., LEACH, M. W., COFFMAN, R. L. & POWRIE, F. 1999. 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.
- BABA, M., IMAI, T., NISHIMURA, M., KAKIZAKI, M., TAKAGI, S., HIESHIMA, K., NOMIYAMA, H. & YOSHIE, O. 1997. Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC. *J Biol Chem*, 272, 14893-8.
- BAL, S. M., GOLEBSKI, K. & SPITS, H. 2020. Plasticity of innate lymphoid cell subsets. *Nat Rev Immunol*, 20, 552-565.
- BEHFARJAM, F., NASSERI-MOGHADDAM, S. & JADALI, Z. 2019. Enhanced Th17 Responses in Patients with Autoimmune Hepatitis. *Middle East J Dig Dis*, 11, 98-103.
- BENNETT, C. L., CHRISTIE, J., RAMSDELL, F., BRUNKOW, M. E., FERGUSON, P. J., WHITESELL, L., KELLY, T. E., SAULSBURY, F. T., CHANCE, P. F. & OCHS, H. D. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature Genetics*, 27, 20-21.
- BERIOU, G., COSTANTINO, C. M., ASHLEY, C. W., YANG, L., KUCHROO, V. K., BAECHER-ALLAN, C. & HAFLER, D. A. 2009. IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood*, 113, 4240-9.
- BERNUZZI, F., FENOGLIO, D., BATTAGLIA, F., FRAVEGA, M., GERSHWIN, M. E., INDIVERI, F., ANSARI, A. A., PODDA, M., INVERNIZZI, P. & FILACI, G. 2010. Phenotypical and functional alterations of CD8 regulatory T cells in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun*, 35, 176-80.

- BETTELLI, E., CARRIER, Y., GAO, W., KORN, T., STROM, T. B., OUKKA, M., WEINER, H. L. & KUCHROO, V. K. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441, 235-8.
- BEUTLER, B. & CERAMI, A. 1988. TUMOR NECROSIS, CACHEXIA, SHOCK, AND INFLAMMATION: A COMMON MEDIATOR. *Annual Review of Biochemistry*, 57, 505-518.
- BLACK, R. A., RAUCH, C. T., KOZLOSKY, C. J., PESCHON, J. J., SLACK, J. L., WOLFSON, M. F., CASTNER, B. J., STOCKING, K. L., REDDY, P., SRINIVASAN, S., NELSON, N., BOIANI, N., SCHOOLEY, K. A., GERHART, M., DAVIS, R., FITZNER, J. N., JOHNSON, R. S., PAXTON, R. J., MARCH, C. J. & CERRETTI, D. P. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*, 385, 729-33.
- BLAU, H. M. & BALTIMORE, D. 1991. Differentiation requires continuous regulation. *J Cell Biol*, 112, 781-3.
- BLAU, H. M., PAVLATH, G. K., HARDEMAN, E. C., CHIU, C. P., SILBERSTEIN, L., WEBSTER, S. G., MILLER, S. C. & WEBSTER, C. 1985. Plasticity of the differentiated state. *Science*, 230, 758-66.
- BLUESTONE, J. A., BUCKNER, J. H., FITCH, M., GITELMAN, S. E., GUPTA, S., HELLERSTEIN, M. K., HEROLD, K. C., LARES, A., LEE, M. R., LI, K., LIU, W., LONG, S. A., MASIELLO, L. M., NGUYEN, V., PUTNAM, A. L., RIECK, M., SAYRE, P. H. & TANG, Q. 2015. Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Sci Transl Med*, 7, 315ra189.
- BOEHM, U., KLAMP, T., GROOT, M. & HOWARD, J. C. 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*, 15, 749-95.
- BOGDANOS, D. P., MIELI-VERGANI, G. & VERGANI, D. 2009. Autoantibodies and their Antigens in Autoimmune Hepatitis. *Semin Liver Dis*, 29, 241-253.
- BONILLA, F. A. & OETTGEN, H. C. 2010. Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, S33-S40.
- BORSELLINO, G., KLEINWIETFELD, M., DI MITRI, D., STERNJAK, A., DIAMANTINI, A., GIOMETTO, R., HÖPNER, S., CENTONZE, D., BERNARDI, G., DELL'ACQUA, M. L., ROSSINI, P. M., BATTISTINI, L., RÖTZSCHKE, O. & FALK, K. 2007. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*, 110, 1225-1232.
- BOUNEAUD, C., KOURILSKY, P. & BOUSSO, P. 2000. Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity*, 13, 829-40.
- BOVENSIEPEN, C. S., SCHAKAT, M., SEBODE, M., ZENOZI, R., HARTL, J., PEISELER, M., LI, J., HENZE, L., WOESTEMEIER, A., SCHRAMM, C., LOHSE, A. W., HERKEL, J. & WEILER-NORMANN, C. 2019. TNF-Producing Th1 Cells Are Selectively Expanded in Liver Infiltrates of Patients with Autoimmune Hepatitis. *J Immunol*, 203, 3148-3156.
- BROWN, J. A., DORFMAN, D. M., MA, F. R., SULLIVAN, E. L., MUNOZ, O., WOOD, C. R., GREENFIELD, E. A. & FREEMAN, G. J. 2003. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol*, 170, 1257-66.
- BRUNET, J. F., DENIZOT, F., LUCIANI, M. F., ROUX-DOSSETO, M., SUZAN, M., MATTEI, M. G. & GOLSTEIN, P. 1987. A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature*, 328, 267-70.
- BRUNKOW, M. E., JEFFERY, E. W., HJERRILD, K. A., PAEPER, B., CLARK, L. B., YASAYKO, S.-A., WILKINSON, J. E., GALAS, D., ZIEGLER, S. F. & RAMSDELL, F. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature Genetics*, 27, 68-73.
- BUITRAGO-MOLINA, L. E., PIETREK, J., NOYAN, F., SCHLUE, J., MANNS, M. P., WEDEMEYER, H., HARDTKE-WOLENSKI, M. & JAECKEL, E. 2021. Treg-specific IL-2 therapy can reestablish intrahepatic immune regulation in autoimmune hepatitis. *J Autoimmun*, 117, 102591.

- BURNSTOCK, G. & BOEYNAEMS, J. M. 2014. Purinergic signalling and immune cells. *Purinergic Signal*, 10, 529-64.
- BUTCHER, M. J., FILIPOWICZ, A. R., WASEEM, T. C., MCGARY, C. M., CROW, K. J., MAGILNICK, N., BOLDIN, M., LUNDBERG, P. S. & GALKINA, E. V. 2016. Atherosclerosis-Driven Treg Plasticity Results in Formation of a Dysfunctional Subset of Plastic IFN γ + Th1/Tregs. *Circ Res*, 119, 1190-1203.
- CAO, X., CAI, S. F., FEHNIGER, T. A., SONG, J., COLLINS, L. I., PIWNICA-WORMS, D. R. & LEY, T. J. 2007. Granzyme B and Perforin Are Important for Regulatory T Cell-Mediated Suppression of Tumor Clearance. *Immunity*, 27, 635-646.
- CAPOBIANCHI, M. R., ULERI, E., CAGLIOTI, C. & DOLEI, A. 2015. Type I IFN family members: similarity, differences and interaction. *Cytokine Growth Factor Rev*, 26, 103-11.
- CARAMBIA, A., FREUND, B., SCHWINGE, D., HEINE, M., LASCHTOWITZ, A., HUBER, S., WRAITH, D. C., KORN, T., SCHRAMM, C., LOHSE, A. W., HEEREN, J. & HERKEL, J. 2014. TGF- β -dependent induction of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs by liver sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol*, 61, 594-9.
- CAREY, E. J., ALI, A. H. & LINDOR, K. D. 2015. Primary biliary cirrhosis. *Lancet*, 386, 1565-75.
- CARSWELL, E. A., OLD, L. J., KASSEL, R. L., GREEN, S., FIORE, N. & WILLIAMSON, B. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 3666-70.
- CHEN, W., JIN, W., HARDEGEN, N., LEI, K. J., LI, L., MARINOS, N., MCGRADY, G. & WAHL, S. M. 2003. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*, 198, 1875-86.
- CHEN, X., WU, X., ZHOU, Q., HOWARD, O. M., NETEA, M. G. & OPPENHEIM, J. J. 2013. TNFR2 is critical for the stabilization of the CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T. cell phenotype in the inflammatory environment. *J Immunol*, 190, 1076-84.
- CHEN, Y.-Y., JEFFERY, H. C., HUNTER, S., BHOGAL, R., BIRTWISTLE, J., BRAITCH, M. K., ROBERTS, S., MING, M., HANNAH, J., THOMAS, C., ADALI, G., HÜBSCHER, S. G., SYN, W.-K., AFFORD, S., LALOR, P. F., ADAMS, D. H. & OO, Y. H. 2016. Human intrahepatic regulatory T cells are functional, require IL-2 from effector cells for survival, and are susceptible to Fas ligand-mediated apoptosis. *Hepatology*, 64, 138-150.
- CHOI, Y. S., JUNG, M. K., LEE, J., CHOI, S. J., CHOI, S. H., LEE, H. W., LEE, J.-J., KIM, H. J., AHN, S. H., LEE, D. H., KIM, W., PARK, S.-H., HUH, J. R., KIM, H.-P., PARK, J. Y. & SHIN, E.-C. 2018. Tumor Necrosis Factor-producing T-regulatory Cells Are Associated With Severe Liver Injury in Patients With Acute Hepatitis A. *Gastroenterology*, 154, 1047-1060.
- COBB, B. S. & SMALE, S. T. 2005. Ikaros-family proteins: in search of molecular functions during lymphocyte development. *Curr Top Microbiol Immunol*, 290, 29-47.
- CONG, Y., WEAVER, C. T., LAZENBY, A. & ELSON, C. O. 2002. Bacterial-reactive T regulatory cells inhibit pathogenic immune responses to the enteric flora. *J Immunol*, 169, 6112-9.
- COOK, D. N., PROSSER, D. M., FORSTER, R., ZHANG, J., KUKLIN, N. A., ABBONDANZO, S. J., NIU, X. D., CHEN, S. C., MANFRA, D. J., WIEKOWSKI, M. T., SULLIVAN, L. M., SMITH, S. R., GREENBERG, H. B., NARULA, S. K., LIPP, M. & LIRA, S. A. 2000. CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue. *Immunity*, 12, 495-503.
- COUPER, K. N., BLOUNT, D. G. & RILEY, E. M. 2008. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol*, 180, 5771-7.
- CURRAN, C. S. & SHARON, E. 2017. PD-1 immunobiology in autoimmune hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Semin Oncol*, 44, 428-432.
- CZAJA, A. J. 2017. Global Disparities and Their Implications in the Occurrence and Outcome of Autoimmune Hepatitis. *Digestive Diseases and Sciences*, 62, 2277-2292.

- CZAJA, A. J. & MANNS, M. P. 2010. Advances in the Diagnosis, Pathogenesis, and Management of Autoimmune Hepatitis. *Gastroenterology*, 139, 58-72.e4.
- DANIEL, V., TROJAN, K. & OPELZ, G. 2016. Immunosuppressive drugs affect induction of IFN γ + Treg in vitro. *Hum Immunol*, 77, 146-152.
- DE ANDREA, M., RAVERA, R., GIOIA, D., GARIGLIO, M. & LANDOLFO, S. 2002. The interferon system: an overview. *Eur J Paediatr Neurol*, 6 Suppl A, A41-6; discussion A55-8.
- DEAGLIO, S., DWYER, K. M., GAO, W., FRIEDMAN, D., USHEVA, A., ERAT, A., CHEN, J. F., ENJYOJI, K., LINDEN, J., OUKKA, M., KUCHROO, V. K., STROM, T. B. & ROBSON, S. C. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*, 204, 1257-65.
- DEL PRETE, G. 1992. Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. *Allergy*, 47, 450-5.
- DELACHER, M., IMBUSCH, C. D., WEICHENHAN, D., BREILING, A., HOTZ-WAGENBLATT, A., TRÄGER, U., HOFER, A. C., KÄGEBEIN, D., WANG, Q., FRAUHAMMER, F., MALLM, J. P., BAUER, K., HERRMANN, C., LANG, P. A., BRORS, B., PLASS, C. & FEUERER, M. 2017. Genome-wide DNA-methylation landscape defines specialization of regulatory T cells in tissues. *Nat Immunol*, 18, 1160-1172.
- DELGOFFE, G. M., WOO, S.-R., TURNIS, M. E., GRAVANO, D. M., GUY, C., OVERACRE, A. E., BETTINI, M. L., VOGEL, P., FINKELSTEIN, D., BONNEVIER, J., WORKMAN, C. J. & VIGNALI, D. A. A. 2013. Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1–semaphorin-4a axis. *Nature*, 501, 252-256.
- DILEK, N., POIRIER, N., HULIN, P., COULON, F., MARY, C., VILLE, S., VIE, H., CLÉMENTEAU, B., BLANCHO, G. & VANHOVE, B. 2013. Targeting CD28, CTLA-4 and PD-L1 costimulation differentially controls immune synapses and function of human regulatory and conventional T-cells. *PLoS One*, 8, e83139.
- DING, Y., XU, J. & BROMBERG, J. S. 2012. Regulatory T cell migration during an immune response. *Trends Immunol*, 33, 174-80.
- DU, R., ZHAO, H., YAN, F. & LI, H. 2014. IL-17+Foxp3+ T cells: an intermediate differentiation stage between Th17 cells and regulatory T cells. *J Leukoc Biol*, 96, 39-48.
- DUHEN, T., DUHEN, R., LANZAVECCHIA, A., SALLUSTO, F. & CAMPBELL, D. J. 2012. Functionally distinct subsets of human FOXP3+ Treg cells that phenotypically mirror effector Th cells. *Blood*, 119, 4430-40.
- DUPAGE, M. & BLUESTONE, J. A. 2016. Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease. *Nat Rev Immunol*, 16, 149-63.
- DYSON, J. K., BEUERS, U., JONES, D. E. J., LOHSE, A. W. & HUDSON, M. 2018. Primary sclerosing cholangitis. *Lancet*, 391, 2547-2559.
- EARL, L. A. & BAUM, L. G. 2008. CD45 Glycosylation controls T-cell life and death. *Immunology & Cell Biology*, 86, 608-615.
- EASL 2015. EASL Clinical Practice Guidelines: Autoimmune hepatitis. *J Hepatol*, 63, 971-1004.
- EBERL, G. 2017. ROR γ t, a multitask nuclear receptor at mucosal surfaces. *Mucosal Immunology*, 10, 27-34.
- ELTANBOULY, M. A. & NOELLE, R. J. 2021. Rethinking peripheral T cell tolerance: checkpoints across a T cell's journey. *Nature Reviews Immunology*, 21, 257-267.
- FELD, J. J., DINH, H., ARENOVICH, T., MARCUS, V. A., WANLESS, I. R. & HEATHCOTE, E. J. 2005. Autoimmune hepatitis: effect of symptoms and cirrhosis on natural history and outcome. *Hepatology*, 42, 53-62.
- FERRI, S., LONGHI, M. S., DE MOLO, C., LALANNE, C., MURATORI, P., GRANITO, A., HUSSAIN, M. J., MA, Y., LENZI, M., MIELI-VERGANI, G., BIANCHI, F. B., VERGANI, D. & MURATORI, L. 2010. A multifaceted imbalance of T cells with regulatory function characterizes type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology*, 52, 999-1007.

- FLETCHER, J. M., LONERGAN, R., COSTELLOE, L., KINSELLA, K., MORAN, B., O'FARRELLY, C., TUBRIDY, N. & MILLS, K. H. 2009. CD39+Foxp3+ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *J Immunol*, 183, 7602-10.
- FLOESS, S., FREYER, J., SIEWERT, C., BARON, U., OLEK, S., POLANSKY, J., SCHLAWKE, K., CHANG, H. D., BOPP, T., SCHMITT, E., KLEIN-HESSLING, S., SERFLING, E., HAMANN, A. & HUEHN, J. 2007. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol*, 5, e38.
- FLOREANI, A., LIBERAL, R., VERGANI, D. & MIELI-VERGANI, G. 2013. Autoimmune hepatitis: Contrasts and comparisons in children and adults - a comprehensive review. *J Autoimmun*, 46, 7-16.
- FONTENOT, J. D., GAVIN, M. A. & RUDENSKY, A. Y. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature Immunology*, 4, 330-336.
- FRANCESCHINI, D., PAROLI, M., FRANCAVILLA, V., VIDETTA, M., MORRONE, S., LABBADIA, G., CERINO, A., MONDELLI, M. U. & BARNABA, V. 2009. PD-L1 negatively regulates CD4+CD25+Foxp3+ Tregs by limiting STAT-5 phosphorylation in patients chronically infected with HCV. *J Clin Invest*, 119, 551-64.
- FUKAO, T., FRUCHT, D. M., YAP, G., GADINA, M., O'SHEA, J. J. & KOYASU, S. 2001. Inducible expression of Stat4 in dendritic cells and macrophages and its critical role in innate and adaptive immune responses. *J Immunol*, 166, 4446-55.
- FURUKAWA, A., WISEL, S. A. & TANG, Q. 2016. Impact of Immune-Modulatory Drugs on Regulatory T Cell. *Transplantation*, 100, 2288-2300.
- GABAY, C. & KUSHNER, I. 1999. Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. *New England Journal of Medicine*, 340, 448-454.
- GAFFEN, S. L. 2009. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol*, 9, 556-67.
- GAFFEN, S. L., JAIN, R., GARG, A. V. & CUA, D. J. 2014. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat Rev Immunol*, 14, 585-600.
- GANDHI, R., KUMAR, D., BURNS, E. J., NADEAU, M., DAKE, B., LARONI, A., KOZORIZ, D., WEINER, H. L. & QUINTANA, F. J. 2010. Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3(+) regulatory T cells. *Nat Immunol*, 11, 846-53.
- GATSELIS, N. K., ZACHOU, K., KOUKOULIS, G. K. & DALEKOS, G. N. 2015. Autoimmune hepatitis, one disease with many faces: etiopathogenetic, clinico-laboratory and histological characteristics. *World journal of gastroenterology*, 21, 60-83.
- GEGE, C. 2021. Retinoic acid-related orphan receptor gamma t (ROR γ t) inverse agonists/antagonists for the treatment of inflammatory diseases - where are we presently? *Expert Opin Drug Discov*, 16, 1517-1535.
- GERSHON, R. K. & KONDO, K. 1970. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*, 18, 723-37.
- GETNET, D., GROSSO, J. F., GOLDBERG, M. V., HARRIS, T. J., YEN, H. R., BRUNO, T. C., DURHAM, N. M., HIPKISS, E. L., PYLE, K. J., WADA, S., PAN, F., PARDOLL, D. M. & DRAKE, C. G. 2010. A role for the transcription factor Helios in human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Mol Immunol*, 47, 1595-600.
- GIANCHECCHI, E. & FIERABRACCI, A. 2018. Inhibitory Receptors and Pathways of Lymphocytes: The Role of PD-1 in Treg Development and Their Involvement in Autoimmunity Onset and Cancer Progression. *Front Immunol*, 9, 2374.
- GLIMCHER, L. H. & MURPHY, K. M. 2000. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev*, 14, 1693-711.
- GODFREY, V. L., WILKINSON, J. E., RINCHIK, E. M. & RUSSELL, L. B. 1991. Fatal lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mouse requires T cells that mature in a sf thymic environment: potential model for thymic education. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 5528-32.
- GRANT, C. R., HOLDER, B. S., LIBERAL, R., HENEGHAN, M. A., MA, Y., MIELI-VERGANI, G., VERGANI, D. & LONGHI, M. S. 2017. Immunosuppressive drugs affect interferon

- (IFN)- γ and programmed cell death 1 (PD-1) kinetics in patients with newly diagnosed autoimmune hepatitis. *Clin Exp Immunol*, 189, 71-82.
- GRANT, C. R., LIBERAL, R., HOLDER, B. S., CARDONE, J., MA, Y., ROBSON, S. C., MIELI-VERGANI, G., VERGANI, D. & LONGHI, M. S. 2014. Dysfunctional CD39(POS) regulatory T cells and aberrant control of T-helper type 17 cells in autoimmune hepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 59, 1007-1015.
- GRANT, C. R., LIBERAL, R., MIELI-VERGANI, G., VERGANI, D. & LONGHI, M. S. 2015. Regulatory T-cells in autoimmune diseases: challenges, controversies and--yet--unanswered questions. *Autoimmun Rev*, 14, 105-16.
- GRELL, M., DOUNI, E., WAJANT, H., LÖHDEN, M., CLAUSS, M., MAXEINER, B., GEORGOPOULOS, S., LESSLAUER, W., KOLLIAS, G., PFIZENMAIER, K. & SCHEURICH, P. 1995. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*, 83, 793-802.
- GROSSMAN, W. J., VERBSKY, J. W., BARCHET, W., COLONNA, M., ATKINSON, J. P. & LEY, T. J. 2004. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*, 21, 589-601.
- HAHM, K., COBB, B. S., MCCARTY, A. S., BROWN, K. E., KLUG, C. A., LEE, R., AKASHI, K., WEISSMAN, I. L., FISHER, A. G. & SMALE, S. T. 1998. Helios, a T cell-restricted Ikaros family member that quantitatively associates with Ikaros at centromeric heterochromatin. *Genes Dev*, 12, 782-96.
- HANSSON, G. K. & HERMANSSON, A. 2011. The immune system in atherosclerosis. *Nature Immunology*, 12, 204-212.
- HARDTKE-WOLENSKI, M., FISCHER, K., NOYAN, F., SCHLUE, J., FALK, C. S., STAHLHUT, M., WOLLER, N., KUEHNEL, F., TAUBERT, R., MANNS, M. P. & JAECKEL, E. 2013. Genetic predisposition and environmental danger signals initiate chronic autoimmune hepatitis driven by CD4+ T cells. *Hepatology*, 58, 718-28.
- HARTIGAN-O'CONNOR, D. J., POON, C., SINCLAIR, E. & MCCUNE, J. M. 2007. Human CD4+ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells. *J Immunol Methods*, 319, 41-52.
- HENEGHAN, M. A., YEOMAN, A. D., VERMA, S., SMITH, A. D. & LONGHI, M. S. 2013. Autoimmune hepatitis. *The Lancet*, 382, 1433-1444.
- HENNES, E. M., ZENIYA, M., CZAJA, A. J., PARÉS, A., DALEKOS, G. N., KRAWITT, E. L., BITTENCOURT, P. L., PORTA, G., BOBERG, K. M., HOFER, H., BIANCHI, F. B., SHIBATA, M., SCHRAMM, C., EISENMANN DE TORRES, B., GALLE, P. R., MCFARLANE, I., DIENES, H.-P., LOHSE, A. W. & GROUP, I. A. H. 2008. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology*, 48, 169-176.
- HERKEL, J., CARAMBIA, A. & LOHSE, A. W. 2020. Autoimmune hepatitis: Possible triggers, potential treatments. *J Hepatol*.
- HEYMANN, F., PEUSQUENS, J., LUDWIG-PORTUGALL, I., KOHLHEPP, M., ERGEN, C., NIEMIETZ, P., MARTIN, C., VAN ROOIJEN, N., OCHANDO, J. C., RANDOLPH, G. J., LUEDDE, T., GINHOUX, F., KURTS, C., TRAUTWEIN, C. & TACKE, F. 2015. Liver inflammation abrogates immunological tolerance induced by Kupffer cells. *Hepatology*, 62, 279-91.
- HIMMEL, M. E., MACDONALD, K. G., GARCIA, R. V., STEINER, T. S. & LEVINGS, M. K. 2013. Helios+ and Helios- cells coexist within the natural FOXP3+ T regulatory cell subset in humans. *J Immunol*, 190, 2001-8.
- HOFFMAN, B. E., MARTINO, A. T., SACK, B. K., CAO, O., LIAO, G., TERHORST, C. & HERZOG, R. W. 2011. Nonredundant roles of IL-10 and TGF- β in suppression of immune responses to hepatic AAV-factor IX gene transfer. *Mol Ther*, 19, 1263-72.
- HOMBERG, J. C., ABUAF, N., BERNARD, O., ISLAM, S., ALVAREZ, F., KHALIL, S. H., POUPON, R., DARNIS, F., LÉVY, V. G., GRIPPON, P. & ET AL. 1987. Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type 1: a second type of "autoimmune" hepatitis. *Hepatology*, 7, 1333-9.
- HORI, S., NOMURA, T. & SAKAGUCHI, S. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299, 1057-61.

- HORIUCHI, S., ONODERA, A., HOSOKAWA, H., WATANABE, Y., TANAKA, T., SUGANO, S., SUZUKI, Y. & NAKAYAMA, T. 2011. Genome-wide analysis reveals unique regulation of transcription of Th2-specific genes by GATA3. *J Immunol*, 186, 6378-89.
- HSIEH, C. S., LEE, H. M. & LIO, C. W. 2012. Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nat Rev Immunol*, 12, 157-67.
- HU, X., CHEN, Y., SHEN, Y., TIAN, R., SHENG, Y. & QUE, H. 2022. Global prevalence and epidemiological trends of Hashimoto's thyroiditis in adults: A systematic review and meta-analysis. *Front Public Health*, 10, 1020709.
- HU, X. & IVASHKIV, L. B. 2009. Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma: implications for immune responses and autoimmune diseases. *Immunity*, 31, 539-50.
- HUANG, C., SHEN, Y., SHEN, M., FAN, X., MEN, R., YE, T. & YANG, L. 2021. Glucose Metabolism Reprogramming of Regulatory T Cells in Concanavalin A-Induced Hepatitis. *Front Pharmacol*, 12, 726128.
- HUANG, Z., NIE, S., WANG, H., YAN, W., TIAN, D. & LIU, M. 2023. The proportion of regulatory T cells in peripheral blood of patients with autoimmune hepatitis: A systematic review and meta-analysis. *Int Immunopharmacol*, 122, 110576.
- HÜBENER, S., OO, Y. H., THAN, N. N., HÜBENER, P., WEILER-NORMANN, C., LOHSE, A. W. & SCHRAMM, C. 2016. Efficacy of 6-Mercaptopurine as Second-Line Treatment for Patients With Autoimmune Hepatitis and Azathioprine Intolerance. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 14, 445-53.
- HUGHES, C. E. & NIBBS, R. J. B. 2018. A guide to chemokines and their receptors. *Febs j*, 285, 2944-2971.
- IDZKO, M., DICHMANN, S., FERRARI, D., DI VIRGILIO, F., LA SALA, A., GIROLOMONI, G., PANTHER, E. & NORGAEUER, J. 2002. Nucleotides induce chemotaxis and actin polymerization in immature but not mature human dendritic cells via activation of pertussis toxin-sensitive P2y receptors. *Blood*, 100, 925-32.
- ISAACS, A., LINDENMANN, J. & ANDREWES, C. H. 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences*, 147, 258-267.
- ITOH, M., TAKAHASHI, T., SAKAGUCHI, N., KUNIYASU, Y., SHIMIZU, J., OTSUKA, F. & SAKAGUCHI, S. 1999. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol*, 162, 5317-26.
- IVANOV, II, MCKENZIE, B. S., ZHOU, L., TADOKORO, C. E., LEPELLEY, A., LAFAILLE, J. J., CUA, D. J. & LITTMAN, D. R. 2006. The orphan nuclear receptor ROR γ mat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*, 126, 1121-33.
- JANG, D. I., LEE, A. H., SHIN, H. Y., SONG, H. R., PARK, J. H., KANG, T. B., LEE, S. R. & YANG, S. H. 2021. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics. *Int J Mol Sci*, 22.
- JEFFERY, H. C., HUNTER, S., HUMPHREYS, E. H., BHOGAL, R., WAWMAN, R. E., BIRTWISTLE, J., ATIF, M., BAGNAL, C. J., RODRIGUEZ BLANCO, G., RICHARDSON, N., WARNER, S., DUNN, W. B., AFFORD, S. C., ADAMS, D. H. & OO, Y. H. 2019. Bidirectional Cross-Talk between Biliary Epithelium and Th17 Cells Promotes Local Th17 Expansion and Bile Duct Proliferation in Biliary Liver Diseases. *J Immunol*, 203, 1151-1159.
- JOHN, K., HARDTKE-WOLENSKI, M., JAECKEL, E., MANNS, M. P., SCHULZE-OSTHOFF, K. & BANTEL, H. 2017. Increased apoptosis of regulatory T cells in patients with active autoimmune hepatitis. *Cell Death Dis*, 8, 3219.
- JONULEIT, H., SCHMITT, E., KAKIRMAN, H., STASSEN, M., KNOP, J. & ENK, A. H. 2002. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J Exp Med*, 196, 255-60.
- JONULEIT, H., SCHMITT, E., STASSEN, M., TUETTENBERG, A., KNOP, J. & ENK, A. H. 2001. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med*, 193, 1285-94.

- KAPLAN, M. H., SCHINDLER, U., SMILEY, S. T. & GRUSBY, M. J. 1996. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity*, 4, 313-9.
- KARLSEN, T. H., FOLSERAAS, T., THORBURN, D. & VESTERHUS, M. 2017. Primary sclerosing cholangitis - a comprehensive review. *J Hepatol*, 67, 1298-1323.
- KASPROWICZ, D. J., SMALLWOOD, P. S., TYZNIK, A. J. & ZIEGLER, S. F. 2003. Scurfin (FoxP3) controls T-dependent immune responses in vivo through regulation of CD4+ T cell effector function. *J Immunol*, 171, 1216-23.
- KEIR, M. E., FREEMAN, G. J. & SHARPE, A. H. 2007. PD-1 regulates self-reactive CD8+ T cell responses to antigen in lymph nodes and tissues. *J Immunol*, 179, 5064-70.
- KHADER, S. A., GAFFEN, S. L. & KOLLS, J. K. 2009. Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosal Immunol*, 2, 403-11.
- KIM, H. J., BARNITZ, R. A., KRESLAVSKY, T., BROWN, F. D., MOFFETT, H., LEMIEUX, M. E., KAYGUSUZ, Y., MEISSNER, T., HOLDERRIED, T. A., CHAN, S., KASTNER, P., HAINING, W. N. & CANTOR, H. 2015. Stable inhibitory activity of regulatory T cells requires the transcription factor Helios. *Science*, 350, 334-9.
- KIM, H. P., IMBERT, J. & LEONARD, W. J. 2006. Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev*, 17, 349-66.
- KIM, M. J., KIM, K., PARK, H. J., KIM, G. R., HONG, K. H., OH, J. H., SON, J., PARK, D. J., KIM, D., CHOI, J. M., LEE, I. & HA, S. J. 2023. Deletion of PD-1 destabilizes the lineage identity and metabolic fitness of tumor-infiltrating regulatory T cells. *Nat Immunol*, 24, 148-161.
- KIM, Y. C., BHAIKAVABHOTLA, R., YOON, J., GOLDING, A., THORNTON, A. M., TRAN, D. Q. & SHEVACH, E. M. 2012. Oligodeoxynucleotides stabilize Helios-expressing Foxp3+ human T regulatory cells during in vitro expansion. *Blood*, 119, 2810-8.
- KLEIN, L., HINTERBERGER, M., WIRNSBERGER, G. & KYEWSKI, B. 2009. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol*, 9, 833-44.
- KOCH, M. A., TUCKER-HEARD, G., PERDUE, N. R., KILLEBREW, J. R., URDAHL, K. B. & CAMPBELL, D. J. 2009. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol*, 10, 595-602.
- KOLLS, J. K. & LINDÉN, A. 2004. Interleukin-17 Family Members and Inflammation. *Immunity*, 21, 467-476.
- KOMATSU, N., OKAMOTO, K., SAWA, S., NAKASHIMA, T., OH-HORA, M., KODAMA, T., TANAKA, S., BLUESTONE, J. A. & TAKAYANAGI, H. 2014. Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat Med*, 20, 62-8.
- KOTENKO, S. V., GALLAGHER, G., BAURIN, V. V., LEWIS-ANTES, A., SHEN, M., SHAH, N. K., LANGER, J. A., SHEIKH, F., DICKENSHEETS, H. & DONNELLY, R. P. 2003. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol*, 4, 69-77.
- KOTZIN, B. L. 1996. Systemic lupus erythematosus. *Cell*, 85, 303-6.
- KRISHNAMOORTHY, N., KHARE, A., ORISS, T. B., RAUNDHAL, M., MORSE, C., YARLAGADDA, M., WENZEL, S. E., MOORE, M. L., PEEBLES, R. S., JR., RAY, A. & RAY, P. 2012. Early infection with respiratory syncytial virus impairs regulatory T cell function and increases susceptibility to allergic asthma. *Nat Med*, 18, 1525-30.
- KUEHN, H. S., OUYANG, W., LO, B., DEENICK, E. K., NIEMELA, J. E., AVERY, D. T., SCHICKEL, J.-N., TRAN, D. Q., STODDARD, J., ZHANG, Y., FRUCHT, D. M., DUMITRIU, B., SCHEINBERG, P., FOLIO, L. R., FREIN, C. A., PRICE, S., KOH, C., HELLER, T., SEROOGY, C. M., HUTTENLOCHER, A., RAO, V. K., SU, H. C., KLEINER, D., NOTARANGELO, L. D., RAMPERTAAP, Y., OLIVIER, K. N., MCELWEE, J., HUGHES, J., PITTALUGA, S., OLIVEIRA, J. B., MEFFRE, E., FLEISHER, T. A., HOLLAND, S. M., LENARDO, M. J., TANGYE, S. G. & UZEL, G. 2014. Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in *CTLA4*. *Science*, 345, 1623-1627.

- KULKARNI, N., MEITEI, H. T., SONAR, S. A., SHARMA, P. K., MUJEEB, V. R., SRIVASTAVA, S., BOPPANA, R. & LAL, G. 2018. CCR6 signaling inhibits suppressor function of induced-Treg during gut inflammation. *J Autoimmun*, 88, 121-130.
- KURT, A. S., STROBL, K., RUIZ, P., OSBORN, G., CHESTER, T., DAWSON, L., WARWAS, K. M., GREY, E. H., MASTORIDIS, S., KODELA, E., SAFINIA, N., SANCHEZ-FUEYO, A. & MARTINEZ-LLORDELLA, M. 2022. IL-2 availability regulates the tissue specific phenotype of murine intra-hepatic Tregs. *Front Immunol*, 13, 1040031.
- LA SALA, A., FERRARI, D., CORINTI, S., CAVANI, A., DI VIRGILIO, F. & GIROLOMONI, G. 2001. Extracellular ATP induces a distorted maturation of dendritic cells and inhibits their capacity to initiate Th1 responses. *J Immunol*, 166, 1611-7.
- LAFLEUR, M. W., MUROYAMA, Y., DRAKE, C. G. & SHARPE, A. H. 2018. Inhibitors of the PD-1 Pathway in Tumor Therapy. *J Immunol*, 200, 375-383.
- LAM, A. J., UDAY, P., GILLIES, J. K. & LEVINGS, M. K. 2022. Helios is a marker, not a driver, of human Treg stability. *Eur J Immunol*, 52, 75-84.
- LAN, R. Y., CHENG, C., LIAN, Z. X., TSUNEYAMA, K., YANG, G. X., MORITOKI, Y., CHUANG, Y. H., NAKAMURA, T., SAITO, S., SHIMODA, S., TANAKA, A., BOWLUS, C. L., TAKANO, Y., ANSARI, A. A., COPPEL, R. L. & GERSHWIN, M. E. 2006. Liver-targeted and peripheral blood alterations of regulatory T cells in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*, 43, 729-37.
- LANGRISH, C. L., CHEN, Y., BLUMENSCHNEIN, W. M., MATTSON, J., BASHAM, B., SEDGWICK, J. D., MCCLANAHAN, T., KASTELEIN, R. A. & CUA, D. J. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*, 201, 233-40.
- LAZARIDIS, K. N. & LARUSSO, N. F. 2016. Primary Sclerosing Cholangitis. *New England Journal of Medicine*, 375, 1161-1170.
- LEE, I., WANG, L., WELLS, A. D., DORF, M. E., OZKAYNAK, E. & HANCOCK, W. W. 2005. Recruitment of Foxp3+ T regulatory cells mediating allograft tolerance depends on the CCR4 chemokine receptor. *J Exp Med*, 201, 1037-44.
- LENSCHOW, D. J., WALUNAS, T. L. & BLUESTONE, J. A. 1996. CD28/B7 SYSTEM OF T CELL COSTIMULATION. *Annual Review of Immunology*, 14, 233-258.
- LI, X., BECHARA, R., ZHAO, J., MCGEACHY, M. J. & GAFFEN, S. L. 2019. IL-17 receptor-based signaling and implications for disease. *Nat Immunol*, 20, 1594-1602.
- LI, Y., SUN, Y., LIU, Y., WANG, B., LI, J., WANG, H., ZHANG, H., WANG, X., HAN, X., LIN, Q., ZHOU, Y., HU, L., SONG, Y., BAO, J., GONG, L., SUN, M., YUAN, X., ZHANG, X., LIAN, M., XIAO, X., MIAO, Q., WANG, Q., LI, K. K., DU, S., MA, A., LI, Y., XU, J., TANG, S., SHI, J., XU, Y., YANG, L., ZHANG, J., HUANG, Z., ZHOU, L., CUI, Y., SELDIN, M. F., GERSHWIN, M. E., YAN, H., ZOU, Z., ZUO, X., TANG, R. & MA, X. 2022. Genome-wide meta-analysis identifies susceptibility loci for autoimmune hepatitis type 1. *Hepatology*, 76, 564-575.
- LIBERAL, R., GRANT, C. R., HOLDER, B. S., CARDONE, J., MARTINEZ-LLORDELLA, M., MA, Y., HENEGHAN, M. A., MIELI-VERGANI, G., VERGANI, D. & LONGHI, M. S. 2015. In autoimmune hepatitis type 1 or the autoimmune hepatitis-sclerosing cholangitis variant defective regulatory T-cell responsiveness to IL-2 results in low IL-10 production and impaired suppression. *Hepatology*, 62, 863-75.
- LINDOR, K. D., GERSHWIN, M. E., POUPON, R., KAPLAN, M., BERGASA, N. V. & HEATHCOTE, E. J. 2009. Primary biliary cirrhosis. *Hepatology*, 50, 291-308.
- LOCHNER, M., PEDUTO, L., CHERRIER, M., SAWA, S., LANGA, F., VARONA, R., RIETHMACHER, D., SI-TAHAR, M., DI SANTO, J. P. & EBERL, G. 2008. In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory IL-10+ Foxp3+ RORgamma t+ T cells. *J Exp Med*, 205, 1381-93.
- LONG, Y., ZHAO, X., XIA, C., LI, X., FAN, C., LIU, C. & WANG, C. 2019. Upregulated IL-17A secretion and CCR6 co-expression in Treg subsets are related to the imbalance of Treg/Th17 cells in active UC patients. *Scand J Immunol*.
- LONG, Y., ZHAO, X., XIA, C., LI, X., FAN, C., LIU, C. & WANG, C. 2020. Upregulated IL-17A secretion and CCR6 co-expression in Treg subsets are related to the imbalance of Treg/Th17 cells in active UC patients. *Scand J Immunol*, 91, e12842.

- LONGHI, M. S., HUSSAIN, M. J., MITRY, R. R., ARORA, S. K., MIELI-VERGANI, G., VERGANI, D. & MA, Y. 2006. Functional study of CD4+CD25+ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis. *J Immunol*, 176, 4484-91.
- LONGHI, M. S., MA, Y., BOGDANOS, D. P., CHEESEMAN, P., MIELI-VERGANI, G. & VERGANI, D. 2004. Impairment of CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells in autoimmune liver disease. *J Hepatol*, 41, 31-7.
- LOWTHER, D. E., GOODS, B. A., LUCCA, L. E., LERNER, B. A., RADDASSI, K., VAN DIJK, D., HERNANDEZ, A. L., DUAN, X., GUNEL, M., CORIC, V., KRISHNASWAMY, S., LOVE, J. C. & HAFLER, D. A. 2016. PD-1 marks dysfunctional regulatory T cells in malignant gliomas. *JCI insight*, 1, e85935.
- LUCKHEERAM, R. V., ZHOU, R., VERMA, A. D. & XIA, B. 2012. CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol*, 2012, 925135.
- LÜTH, S., HERKEL, J., KANZLER, S., FRENZEL, C., GALLE, P. R., DIENES, H. P., SCHRAMM, C. & LOHSE, A. W. 2008. Serologic markers compared with liver biopsy for monitoring disease activity in autoimmune hepatitis. *J Clin Gastroenterol*, 42, 926-30.
- MACK, C. L., ADAMS, D., ASSIS, D. N., KERKAR, N., MANNS, M. P., MAYO, M. J., VIERLING, J. M., ALSAWAS, M., MURAD, M. H. & CZAJA, A. J. 2020. Diagnosis and Management of Autoimmune Hepatitis in Adults and Children: 2019 Practice Guidance and Guidelines From the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*, 72, 671-722.
- MALVIYA, V., YSHII, L., JUNIUS, S., GARG, A. D., HUMBLET-BARON, S. & SCHLENNER, S. M. 2022. Regulatory T cell stability and functional plasticity in health and disease. *Immunol Cell Biol*.
- MANNS, M. 1989. Autoantibodies and antigens in liver diseases--updated. *J Hepatol*, 9, 272-80.
- MANNS, M. P., WOYNAROWSKI, M., KREISEL, W., LURIE, Y., RUST, C., ZUCKERMAN, E., BAHR, M. J., GÜNTHER, R., HULTCRANTZ, R. W., SPENGLER, U., LOHSE, A. W., SZALAY, F., FÄRKILÄ, M., PRÖLS, M. & STRASSBURG, C. P. 2010. Budesonide induces remission more effectively than prednisone in a controlled trial of patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology*, 139, 1198-206.
- MANOHAR, S. M., SHAH, P. & NAIR, A. 2021. Flow cytometry: principles, applications and recent advances. *Bioanalysis*, 13, 181-198.
- MAREK-TRZONKOWSKA, N., MYSLIWIEC, M., DOBYSZUK, A., GRABOWSKA, M., TECHMANSKA, I., JUSCINSKA, J., WUJTEWICZ, M. A., WITKOWSKI, P., MLYNARSKI, W., BALCERSKA, A., MYSLIWSKA, J. & TRZONKOWSKI, P. 2012. Administration of CD4+CD25^{high}CD127⁻ regulatory T cells preserves β -cell function in type 1 diabetes in children. *Diabetes Care*, 35, 1817-20.
- MARRACK, P., KAPPLER, J. & KOTZIN, B. L. 2001. Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nat Med*, 7, 899-905.
- MARSON, A., KRETSCHMER, K., FRAMPTON, G. M., JACOBSEN, E. S., POLANSKY, J. K., MACISAAC, K. D., LEVINE, S. S., FRAENKEL, E., VON BOEHMER, H. & YOUNG, R. A. 2007. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature*, 445, 931-5.
- MCGEACHY, M. J., CUA, D. J. & GAFFEN, S. L. 2019. The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. *Immunity*, 50, 892-906.
- MELSHEIMER, R., GELDHOF, A., APAOLAZA, I. & SCHAIBLE, T. 2019. Remicade(®) (infliximab): 20 years of contributions to science and medicine. *Biologics*, 13, 139-178.
- MIELI-VERGANI, G., VERGANI, D., BAUMANN, U., CZUBKOWSKI, P., DEBRAY, D., DEZSOFI, A., FISCHLER, B., GUPTA, G., HIERRO, L., INDOLFI, G., JAHNEL, J., SMETS, F., VERKADE, H. J. & HADŽIĆ, N. 2018a. Diagnosis and Management of Pediatric Autoimmune Liver Disease: ESPGHAN Hepatology Committee Position Statement. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 66, 345-360.

- MIELI-VERGANI, G., VERGANI, D., CZAJA, A. J., MANNS, M. P., KRAWITT, E. L., VIERLING, J. M., LOHSE, A. W. & MONTANO-LOZA, A. J. 2018b. Autoimmune hepatitis. *Nat Rev Dis Primers*, 4, 18017.
- MIYARA, M., YOSHIOKA, Y., KITO, A., SHIMA, T., WING, K., NIWA, A., PARIZOT, C., TAFLIN, C., HEIKE, T., VALEYRE, D., MATHIAN, A., NAKAHATA, T., YAMAGUCHI, T., NOMURA, T., ONO, M., AMOURA, Z., GOROCHOV, G. & SAKAGUCHI, S. 2009. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*, 30, 899-911.
- MOORE, K. W., DE WAAL MALEFYT, R., COFFMAN, R. L. & O'GARRA, A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*, 19, 683-765.
- MOUCHESS, M. L. & ANDERSON, M. 2014. Central tolerance induction. *Curr Top Microbiol Immunol*, 373, 69-86.
- MUNDER, M., MALLO, M., EICHMANN, K. & MODOLELL, M. 1998. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med*, 187, 2103-8.
- MURPHY, K. & WEAVER, C. 2018. *Janeway Immunologie*, Springer-Verlag.
- NAKAGAWA, H., SIDO, J. M., REYES, E. E., KIERS, V., CANTOR, H. & KIM, H. J. 2016. Instability of Helios-deficient Tregs is associated with conversion to a T-effector phenotype and enhanced antitumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 6248-53.
- NISHIMURA, H., NOSE, M., HIAI, H., MINATO, N. & HONJO, T. 1999. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*, 11, 141-51.
- NISHIMURA, H., OKAZAKI, T., TANAKA, Y., NAKATANI, K., HARA, M., MATSUMORI, A., SASAYAMA, S., MIZOGUCHI, A., HIAI, H., MINATO, N. & HONJO, T. 2001. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science*, 291, 319-22.
- NOVAL RIVAS, M., BURTON, O. T., WISE, P., CHARBONNIER, L. M., GEORGIEV, P., OETTGEN, H. C., RACHID, R. & CHATILA, T. A. 2015. Regulatory T cell reprogramming toward a Th2-cell-like lineage impairs oral tolerance and promotes food allergy. *Immunity*, 42, 512-23.
- NOVAL RIVAS, M. & CHATILA, T. A. 2016. Regulatory T cells in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*, 138, 639-652.
- O'SHEA, J. J. & PAUL, W. E. 2010. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4⁺ T cells. *Science*, 327, 1098-102.
- OKUMURA, A., ISHIKAWA, T., SATO, S., YAMAUCHI, T., OSHIMA, H., OHASHI, T., SATO, K., AYADA, M., HOTTA, N. & KAKUMU, S. 2008. Deficiency of forkhead box P3 and cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 gene expressions and impaired suppressor function of CD4(+)CD25(+) T cells in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology*, 38, 896-903.
- ONISHI, R. M. & GAFFEN, S. L. 2010. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology*, 129, 311-21.
- OO, Y. H., ACKRILL, S., COLE, R., JENKINS, L., ANDERSON, P., JEFFERY, H. C., JONES, N., JEFFERY, L. E., LUTZ, P., WAWMAN, R. E., ATHWAL, A. K., THOMPSON, J., GRAY, J., GUO, K., BARTON, D., HIRSCHFELD, G. M., WONG, T., GUEST, P. & ADAMS, D. H. 2019. Liver homing of clinical grade Tregs after therapeutic infusion in patients with autoimmune hepatitis. *JHEP Rep*, 1, 286-296.
- OO, Y. H., BANZ, V., KAVANAGH, D., LIASKOU, E., WITHERS, D. R., HUMPHREYS, E., REYNOLDS, G. M., LEE-TURNER, L., KALIA, N., HUBSCHER, S. G., KLENERMAN, P., EKSTEEN, B. & ADAMS, D. H. 2012. CXCR3-dependent recruitment and CCR6-mediated positioning of Th-17 cells in the inflamed liver. *J Hepatol*, 57, 1044-51.
- PANNICKE, N., SCHRAMM, C. & LOHSE, A. W. 2012. [Autoimmune liver diseases]. *Internist (Berl)*, 53, 943-54; quiz 955-6.
- PAPE, S., SNIJDERS, R., GEVERS, T. J. G., CHAZOILLERES, O., DALEKOS, G. N., HIRSCHFELD, G. M., LENZI, M., TRAUNER, M., MANNS, M. P., VIERLING, J. M., MONTANO-LOZA, A. J., LOHSE, A. W., SCHRAMM, C., DRENTH, J. P. H. &

- HENEGHAN, M. A. 2022. Systematic review of response criteria and endpoints in autoimmune hepatitis by the International Autoimmune Hepatitis Group. *J Hepatol*, 76, 841-849.
- PARKES, M., CORTES, A., VAN HEEL, D. A. & BROWN, M. A. 2013. Genetic insights into common pathways and complex relationships among immune-mediated diseases. *Nat Rev Genet*, 14, 661-73.
- PARKIN, J. & COHEN, B. 2001. An overview of the immune system. *Lancet*, 357, 1777-89.
- PEISELER, M., SEBODE, M., FRANKE, B., WORTMANN, F., SCHWINGE, D., QUAAS, A., BARON, U., OLEK, S., WIEGARD, C., LOHSE, A. W., WEILER-NORMANN, C., SCHRAMM, C. & HERKEL, J. 2012. FOXP3+ regulatory T cells in autoimmune hepatitis are fully functional and not reduced in frequency. *J Hepatol*, 57, 125-32.
- PERRY, J. A., SHALLBERG, L., CLARK, J. T., GULLICKSRUD, J. A., DELONG, J. H., DOUGLAS, B. B., HART, A. P., LANZAR, Z., O'DEA, K., KONRADT, C., PARK, J., KUCHROO, J. R., GRUBAUGH, D., ZARETSKY, A. G., BRODSKY, I. E., MALEFYT, R. W., CHRISTIAN, D. A., SHARPE, A. H. & HUNTER, C. A. 2022. PD-L1-PD-1 interactions limit effector regulatory T cell populations at homeostasis and during infection. *Nat Immunol*, 23, 743-756.
- PETRILLO, M. G., RONCHETTI, S., RICCI, E., ALUNNO, A., GERLI, R., NOCENTINI, G. & RICCARDI, C. 2015. GITR+ regulatory T cells in the treatment of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*, 14, 117-26.
- PICONESE, S. & BARNABA, V. 2015. Stability of Regulatory T Cells Undermined or Endorsed by Different Type-1 Cytokines. *Adv Exp Med Biol*, 850, 17-30.
- POSTAL, M. & APPENZELLER, S. 2011. The role of Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Cytokine*, 56, 537-43.
- POVOLERI, G. A. M., NOVA-LAMPERTI, E., SCOTTÀ, C., FANELLI, G., CHEN, Y.-C., BECKER, P. D., BOARDMAN, D., COSTANTINI, B., ROMANO, M., PAVLIDIS, P., MCGREGOR, R., PANTAZI, E., CHAUSS, D., SUN, H.-W., SHIH, H.-Y., COUSINS, D. J., COOPER, N., POWELL, N., KEMPER, C., PIROOZANIA, M., LAURENCE, A., KORDASTI, S., KAZEMIAN, M., LOMBARDI, G. & AFZALI, B. 2018. Human retinoic acid-regulated CD161+ regulatory T cells support wound repair in intestinal mucosa. *Nature Immunology*, 19, 1403-1414.
- PRATAMA, A., SCHNELL, A., MATHIS, D. & BENOIST, C. 2020. Developmental and cellular age direct conversion of CD4+ T cells into ROR γ + or Helios+ colon Treg cells. *J Exp Med*, 217.
- PRETI, M., SCHLOTT, L., LÜBBERING, D., KRZIKALLA, D., MÜLLER, A. L., SCHURAN, F. A., POCH, T., SCHAKAT, M., WEIDEMANN, S., LOHSE, A. W., WEILER-NORMANN, C., SEBODE, M., SCHWINGE, D., SCHRAMM, C., CARAMBIA, A. & HERKEL, J. 2021. Failure of thymic deletion and instability of autoreactive Tregs drive autoimmunity in immune-privileged liver. *JCI Insight*, 6.
- QIU, R., ZHOU, L., MA, Y., ZHOU, L., LIANG, T., SHI, L., LONG, J. & YUAN, D. 2020. Regulatory T Cell Plasticity and Stability and Autoimmune Diseases. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 58, 52-70.
- QURESHI, O. S., ZHENG, Y., NAKAMURA, K., ATTRIDGE, K., MANZOTTI, C., SCHMIDT, E. M., BAKER, J., JEFFERY, L. E., KAUR, S., BRIGGS, Z., HOU, T. Z., FUTTER, C. E., ANDERSON, G., WALKER, L. S. & SANSOM, D. M. 2011. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science*, 332, 600-3.
- RAFFIN, C., PIGNON, P., CELSE, C., DEBIEN, E., VALMORI, D. & AYYOUB, M. 2013. Human memory Helios- FOXP3+ regulatory T cells (Tregs) encompass induced Tregs that express Aiolos and respond to IL-1 β by downregulating their suppressor functions. *J Immunol*, 191, 4619-27.
- RAFFIN, C., VO, L. T. & BLUESTONE, J. A. 2020. T(reg) cell-based therapies: challenges and perspectives. *Nat Rev Immunol*, 20, 158-172.
- RAI, E. & WAKELAND, E. K. 2011. Genetic predisposition to autoimmunity--what have we learned? *Semin Immunol*, 23, 67-83.

- RAIMONDI, G., SHUFESKY, W. J., TOKITA, D., MORELLI, A. E. & THOMSON, A. W. 2006. Regulated compartmentalization of programmed cell death-1 discriminates CD4+CD25+ resting regulatory T cells from activated T cells. *J Immunol*, 176, 2808-16.
- RANASINGHE, R. & ERI, R. 2018. Modulation of the CCR6-CCL20 Axis: A Potential Therapeutic Target in Inflammation and Cancer. *Medicina (Kaunas)*, 54.
- RIBAS, A. & WOLCHOK, J. D. 2018. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*, 359, 1350-1355.
- RICE, J. B., WHITE, A. G., SCARPATI, L. M., WAN, G. & NELSON, W. W. 2017. Long-term Systemic Corticosteroid Exposure: A Systematic Literature Review. *Clin Ther*, 39, 2216-2229.
- RICHARDSON, N., WOOTTON, G. E., BOZWARD, A. G. & OO, Y. H. 2022. Challenges and opportunities in achieving effective regulatory T cell therapy in autoimmune liver disease. *Semin Immunopathol*, 44, 461-474.
- ROBINSON, M. W., HARMON, C. & O'FARRELLY, C. 2016. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Cell Mol Immunol*, 13, 267-76.
- ROJAS, M., RESTREPO-JIMÉNEZ, P., MONSALVE, D. M., PACHECO, Y., ACOSTA-AMPUDIA, Y., RAMÍREZ-SANTANA, C., LEUNG, P. S. C., ANSARI, A. A., GERSHWIN, M. E. & ANAYA, J. M. 2018. Molecular mimicry and autoimmunity. *J Autoimmun*, 95, 100-123.
- RONG, G., ZHOU, Y., XIONG, Y., ZHOU, L., GENG, H., JIANG, T., ZHU, Y., LU, H., ZHANG, S., WANG, P., ZHANG, B. & ZHONG, R. 2009. Imbalance between T helper type 17 and T regulatory cells in patients with primary biliary cirrhosis: the serum cytokine profile and peripheral cell population. *Clin Exp Immunol*, 156, 217-25.
- ROSENZWAJG, M., LORENZON, R., CACOUB, P., PHAM, H. P., PITOISET, F., EL SOUFI, K., C, R. I., BERNARD, C., ARACTINGI, S., BANNEVILLE, B., BEAUGERIE, L., BERENBAUM, F., CHAMPEY, J., CHAZOILLERES, O., CORPECHOT, C., FAUTREL, B., MEKINIAN, A., REGNIER, E., SAADOUN, D., SALEM, J. E., SELLAM, J., SEKSIK, P., DAGUENEL-NGUYEN, A., DOPPLER, V., MARIAU, J., VICAUT, E. & KLATZMANN, D. 2019. Immunological and clinical effects of low-dose interleukin-2 across 11 autoimmune diseases in a single, open clinical trial. *Ann Rheum Dis*, 78, 209-217.
- RUDD, C. E., TREVILLYAN, J. M., DASGUPTA, J. D., WONG, L. L. & SCHLOSSMAN, S. F. 1988. The CD4 receptor is complexed in detergent lysates to a protein-tyrosine kinase (pp58) from human T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 5190-5194.
- RUEGG, C. L., RAJASEKAR, S., STEIN, B. S. & ENGLEMAN, E. G. 1992. Degradation of CD4 following phorbol-induced internalization in human T lymphocytes. Evidence for distinct endocytic routing of CD4 and CD3. *J Biol Chem*, 267, 18837-43.
- RUIZ DE MORALES, J. M. G., PUIG, L., DAUDÉN, E., CAÑETE, J. D., PABLOS, J. L., MARTÍN, A. O., JUANATEY, C. G., ADÁN, A., MONTALBÁN, X., BORRUEL, N., ORTÍ, G., HOLGADO-MARTÍN, E., GARCÍA-VIDAL, C., VIZCAYA-MORALES, C., MARTÍN-VÁZQUEZ, V. & GONZÁLEZ-GAY, M. 2020. Critical role of interleukin (IL)-17 in inflammatory and immune disorders: An updated review of the evidence focusing in controversies. *Autoimmun Rev*, 19, 102429.
- RUSSELL, W. L. 1951. X-ray-induced mutations in mice. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 16, 327-36.
- SAKAGUCHI, S., MIKAMI, N., WING, J. B., TANAKA, A., ICHIYAMA, K. & OHKURA, N. 2020. Regulatory T Cells and Human Disease. *Annu Rev Immunol*, 38, 541-566.
- SAKAGUCHI, S., SAKAGUCHI, N., ASANO, M., ITOH, M. & TODA, M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, 155, 1151-64.
- SAMBUCCI, M., GARGANO, F., DE ROSA, V., DE BARDI, M., PICOZZA, M., PLACIDO, R., RUGGIERI, S., CAPONE, A., GASPERINI, C., MATARESE, G., BATTISTINI, L. &

- BORSELLINO, G. 2018. FoxP3 isoforms and PD-1 expression by T regulatory cells in multiple sclerosis. *Scientific reports*, 8, 3674-3674.
- SANTORI, F. R., HUANG, P., VAN DE PAVERT, S. A., DOUGLASS, E. F., JR., LEAVER, D. J., HAUBRICH, B. A., KEBER, R., LORBEK, G., KONIJN, T., ROSALES, B. N., ROZMAN, D., HORVAT, S., RAHIER, A., MEBIUS, R. E., RASTINEJAD, F., NES, W. D. & LITTMAN, D. R. 2015. Identification of natural ROR γ ligands that regulate the development of lymphoid cells. *Cell Metab*, 21, 286-298.
- SCHENK, U., FRASCOLI, M., PROIETTI, M., GEFFERS, R., TRAGGIAI, E., BUER, J., RICORDI, C., WESTENDORF, A. M. & GRASSI, F. 2011. ATP inhibits the generation and function of regulatory T cells through the activation of purinergic P2X receptors. *Sci Signal*, 4, ra12.
- SCHINDLER, H., LUTZ, M. B., RÖLLINGHOFF, M. & BOGDAN, C. 2001. The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4. *J Immunol*, 166, 3075-82.
- SCHRAMM, C. & LOHSE, A. W. 2005. Overlap syndromes of cholestatic liver diseases and auto-immune hepatitis. *Clin Rev Allergy Immunol*, 28, 105-14.
- SCHRODER, K., HERTZOG, P. J., RAVASI, T. & HUME, D. A. 2004. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*, 75, 163-189.
- SCHUTYSER, E., STRUYF, S. & VAN DAMME, J. 2003. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev*, 14, 409-26.
- SEBODE, M., KLOPPENBURG, A., AIGNER, A., LOHSE, A. W., SCHRAMM, C. & LINDER, R. 2020. Population-based study of autoimmune hepatitis and primary biliary cholangitis in Germany: rising prevalences based on ICD codes, yet deficits in medical treatment. *Z Gastroenterol*, 58, 431-438.
- SEBODE, M., PEISELER, M., FRANKE, B., SCHWINGE, D., SCHOKNECHT, T., WORTMANN, F., QUAAS, A., PETERSEN, B. S., ELLINGHAUS, E., BARON, U., OLEK, S., WIEGARD, C., WEILER-NORMANN, C., LOHSE, A. W., HERKEL, J. & SCHRAMM, C. 2014. Reduced FOXP3(+) regulatory T cells in patients with primary sclerosing cholangitis are associated with IL2RA gene polymorphisms. *J Hepatol*, 60, 1010-6.
- SEBODE, M., SCHULZ, L. & LOHSE, A. W. 2017. "Autoimmune(-Like)" Drug and Herb Induced Liver Injury: New Insights into Molecular Pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1954.
- SEBODE, M., WEILER-NORMANN, C., LIWINSKI, T. & SCHRAMM, C. 2018. Autoantibodies in Autoimmune Liver Disease-Clinical and Diagnostic Relevance. *Frontiers in immunology*, 9, 609-609.
- SEDDIKI, N., SANTNER-NANAN, B., MARTINSON, J., ZAUNDERS, J., SASSON, S., LANDAY, A., SOLOMON, M., SELBY, W., ALEXANDER, S. I., NANAN, R., KELLEHER, A. & FAZEKAS DE ST GROTH, B. 2006. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med*, 203, 1693-700.
- SEFIK, E., GEVA-ZATORSKY, N., OH, S., KONNIKOVA, L., ZEMMOUR, D., MCGUIRE, A. M., BURZYN, D., ORTIZ-LOPEZ, A., LOBERA, M., YANG, J., GHOSH, S., EARL, A., SNAPPER, S. B., JUPP, R., KASPER, D., MATHIS, D. & BENOIST, C. 2015. MUCOSAL IMMUNOLOGY. Individual intestinal symbionts induce a distinct population of ROR γ ⁺ regulatory T cells. *Science*, 349, 993-7.
- SHAH, R. A. & KOWDLEY, K. V. 2020. Current and potential treatments for primary biliary cholangitis. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 5, 306-315.
- SHARPE, A. H. & PAUKEN, K. E. 2018. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nature Reviews Immunology*, 18, 153-167.
- SHEPPARD, P., KINDSVOGEL, W., XU, W., HENDERSON, K., SCHLUTSMEYER, S., WHITMORE, T. E., KUESTNER, R., GARRIGUES, U., BIRKS, C., RORABACK, J., OSTRANDER, C., DONG, D., SHIN, J., PRESNELL, S., FOX, B., HALDEMAN, B., COOPER, E., TAFT, D., GILBERT, T., GRANT, F. J., TACKETT, M., KRIVAN, W.,

- MCKNIGHT, G., CLEGG, C., FOSTER, D. & KLUCHER, K. M. 2003. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol*, 4, 63-8.
- SHEVACH, E. M. 2009. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*, 30, 636-45.
- SHEVACH, E. M. & THORNTON, A. M. 2014. tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunol Rev*, 259, 88-102.
- SHI, H. & CHI, H. 2019. Metabolic Control of Treg Cell Stability, Plasticity, and Tissue-Specific Heterogeneity. *Front Immunol*, 10, 2716.
- SOKOLLIK, C., MCLIN, V. A., VERGANI, D., TERZIROLI BERETTA-PICCOLI, B. & MIELI-VERGANI, G. 2018. Juvenile autoimmune hepatitis: A comprehensive review. *Journal of Autoimmunity*, 95, 69-76.
- STRASSBURG, C. P., DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR INNERE, M., DEUTSCHE, M. C. C. U. V., BECKEBAUM, S., GEIER, A., DEUTSCHE LEBERHILFE E, V., GOTTHARDT, D., DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ULTRASCHALL IN DER, M., KLEIN, R., DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ENDOSKOPIE UND BILDGEBENDE, V., MELTER, M., DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR KINDER-UND, J., SCHOTT, E., GESELLSCHAFT FÜR PÄDIATRISCHE, G., SPENGLER, U., DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR, R., TACKE, F., DEUTSCHE, R., TRAUNER, M., DEUTSCHE, T., WEILER-NORMANN, C., DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR PATHOLOGIE UND BUNDESVERBAND DEUTSCHER, P., WEISMÜLLER, T. J., ÖSTERREICHISCHE GESELLSCHAFT FÜR, G., SCHWEIZER GASTROENTEROLOGISCHE, G., TANNAPFEL, A., TISCHENDORF, J. J., SCHRAMM, C., COLLABORATORS, ALBERT, J., ALLESCHER, H.-D., ANTONI, C., BERG, C., BUFLER, P., DANDEL, F., DIETRICH, C., ENGELMANN, G., FEIST, E., FICKERT, P., FISCHER, L., FLECHTENMACHER, C., FRIEDRICH-RUST, M., GIEK, A., GÖRTZ, R. S., HERZER, K., HOFER, H., HOHENESTER, S., HÖHN, M., HÜPPE, D., IN DER SMITTEN, S., JAHNEL, J., KEITEL-ANSELMINO, V., KIRCHNER, G., KREMER, A., LAUENSTEIN, A., LENZEN, H., MAYERLE, J., MÜLLER, T., MÜLLHAUPT, B., NASHAN, B., RUST, C., SCHATTENBERG, J. M., SCHMIDT, H., SCHREYER, A., SEBODE, M., SIEGMUND, B., TERJUNG, B., TEUFEL, A., VAN THIEL, I., WIRTH, S., WITTE, T., EXTERNE BEGUTACHTUNG, D., BEUERS, U., GERKEN, G., GRAZIADEI, I., LOHSE, A., MANNS, M. P. & TILG, H. 2017. S2k Leitlinie Autoimmune Lebererkrankungen. *Z Gastroenterol*, 55, 1135-1226.
- STRAUSS, L., BERGMANN, C., SZCZEPANSKI, M., GOODING, W., JOHNSON, J. T. & WHITESIDE, T. L. 2007. A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res*, 13, 4345-54.
- SUÁREZ, A., LÓPEZ, P., GÓMEZ, J. & GUTIÉRREZ, C. 2006. Enrichment of CD4+CD25high T cell population in patients with systemic lupus erythematosus treated with glucocorticoids. *Ann Rheum Dis*, 65, 1512-7.
- SUN, L., JIN, H. & LI, H. 2016. GARP: a surface molecule of regulatory T cells that is involved in the regulatory function and TGF- β releasing. *Oncotarget*, 7, 42826-42836.
- SUNG, S. S., BJORND AHL, J. M., WANG, C. Y., KAO, H. T. & FU, S. M. 1988. Production of tumor necrosis factor/cachectin by human T cell lines and peripheral blood T lymphocytes stimulated by phorbol myristate acetate and anti-CD3 antibody. *The Journal of experimental medicine*, 167, 937-953.
- TAKABA, H. & TAKAYANAGI, H. 2017. The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. *Trends in Immunology*, 38, 805-816.
- TAKAHAMA, Y. 2006. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nature Reviews Immunology*, 6, 127-135.
- TAKAHASHI, T., TAGAMI, T., YAMAZAKI, S., UEDE, T., SHIMIZU, J., SAKAGUCHI, N., MAK, T. W. & SAKAGUCHI, S. 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)/CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med*, 192, 303-10.

- TAKENAKA, M. C., ROBSON, S. & QUINTANA, F. J. 2016. Regulation of the T Cell Response by CD39. *Trends Immunol*, 37, 427-439.
- TANCHOT, C., TERME, M., PERE, H., TRAN, T., BENHAMOUDA, N., STRIOGA, M., BANISSI, C., GALLUZZI, L., KROEMER, G. & TARTOUR, E. 2013. Tumor-infiltrating regulatory T cells: phenotype, role, mechanism of expansion in situ and clinical significance. *Cancer Microenviron*, 6, 147-57.
- TAO, X., CONSTANT, S., JORRITSMA, P. & BOTTOMLY, K. 1997. Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for Th1 and Th2 CD4+ T cell differentiation. *J Immunol*, 159, 5956-63.
- TAUBERT, R., HARDTKE-WOLENSKI, M., NOYAN, F., WILMS, A., BAUMANN, A. K., SCHLUE, J., OLEK, S., FALK, C. S., MANNS, M. P. & JAECKEL, E. 2014. Intrahepatic regulatory T cells in autoimmune hepatitis are associated with treatment response and depleted with current therapies. *J Hepatol*, 61, 1106-14.
- TERZIROLI BERETTA-PICCOLI, B., MIELI-VERGANI, G. & VERGANI, D. 2022. Autoimmune Hepatitis: Serum Autoantibodies in Clinical Practice. *Clin Rev Allergy Immunol*, 63, 124-137.
- TEUFEL, A., WEINMANN, A., KAHALY, G. J., CENTNER, C., PIENDL, A., WÖRNS, M., LOHSE, A. W., GALLE, P. R. & KANZLER, S. 2010. Concurrent autoimmune diseases in patients with autoimmune hepatitis. *J Clin Gastroenterol*, 44, 208-13.
- THORNTON, A. M., KORTY, P. E., TRAN, D. Q., WOHLFERT, E. A., MURRAY, P. E., BELKAID, Y. & SHEVACH, E. M. 2010. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184, 3433-3441.
- THORNTON, A. M., LU, J., KORTY, P. E., KIM, Y. C., MARTENS, C., SUN, P. D. & SHEVACH, E. M. 2019. Helios(+) and Helios(-) Treg subpopulations are phenotypically and functionally distinct and express dissimilar TCR repertoires. *Eur J Immunol*, 49, 398-412.
- TIVOL, E. A., BORRIELLO, F., SCHWEITZER, A. N., LYNCH, W. P., BLUESTONE, J. A. & SHARPE, A. H. 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*, 3, 541-7.
- TRINCHIERI, G., PFLANZ, S. & KASTELEIN, R. A. 2003. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity*, 19, 641-4.
- URBANO, P. C. M., KOENEN, H. J. P. M., JOOSTEN, I. & HE, X. 2018. An Autocrine TNF α -Tumor Necrosis Factor Receptor 2 Loop Promotes Epigenetic Effects Inducing Human Treg Stability In Vitro. *Frontiers in Immunology*, 9.
- VALENCIA, X., STEPHENS, G., GOLDBACH-MANSKY, R., WILSON, M., SHEVACH, E. M. & LIPSKY, P. E. 2006. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood*, 108, 253-261.
- VELDHOEN, M., HIROTA, K., WESTENDORF, A. M., BUER, J., DUMOUTIER, L., RENAULD, J. C. & STOCKINGER, B. 2008. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature*, 453, 106-9.
- VELDHOEN, M., HOCKING, R. J., ATKINS, C. J., LOCKSLEY, R. M. & STOCKINGER, B. 2006. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, 24, 179-89.
- VIGNALI, D. A., COLLISON, L. W. & WORKMAN, C. J. 2008. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*, 8, 523-32.
- VOLPE, E., SERVANT, N., ZOLLINGER, R., BOGIATZI, S. I., HUPÉ, P., BARILLOT, E. & SOUMELIS, V. 2008. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol*, 9, 650-7.
- VON HERRATH, M. G. & OLDSTONE, M. B. 1996. Virus-induced autoimmune disease. *Curr Opin Immunol*, 8, 878-85.
- VOO, K. S., WANG, Y. H., SANTORI, F. R., BOGGIANO, C., WANG, Y. H., ARIMA, K., BOVER, L., HANABUCHI, S., KHALILI, J., MARINOVA, E., ZHENG, B., LITTMAN, D.

- R. & LIU, Y. J. 2009. Identification of IL-17-producing FOXP3⁺ regulatory T cells in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 4793-8.
- VUERICH, M., HARSHE, R., FRANK, L. A., MUKHERJEE, S., GROMOVA, B., CSIZMADIA, E., NASSER, I. A. M., MA, Y., BONDER, A., PATWARDHAN, V., ROBSON, S. C. & LONGHI, M. S. 2021a. Altered aryl-hydrocarbon-receptor signalling affects regulatory and effector cell immunity in autoimmune hepatitis. *J Hepatol*, 74, 48-57.
- VUERICH, M., WANG, N., KALBASI, A., GRAHAM, J. J. & LONGHI, M. S. 2021b. Dysfunctional Immune Regulation in Autoimmune Hepatitis: From Pathogenesis to Novel Therapies. *Front Immunol*, 12, 746436.
- WALKER, M. R., KASPROWICZ, D. J., GERSUK, V. H., BENARD, A., VAN LANDEGHEN, M., BUCKNER, J. H. & ZIEGLER, S. F. 2003. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4⁺CD25⁻ T cells. *J Clin Invest*, 112, 1437-43.
- WALTER, G. J., EVANS, H. G., MENON, B., GULLICK, N. J., KIRKHAM, B. W., COPE, A. P., GEISSMANN, F. & TAAMS, L. S. 2013. Interaction with activated monocytes enhances cytokine expression and suppressive activity of human CD4⁺CD45^{ro}CD25⁺CD127^(low) regulatory T cells. *Arthritis Rheum*, 65, 627-38.
- WANG, D., ZHANG, H., LIANG, J., GU, Z., ZHOU, Q., FAN, X., HOU, Y. & SUN, L. 2010. CD4⁺CD25⁺ but not CD4⁺Foxp3⁺ T cells as a regulatory subset in primary biliary cirrhosis. *Cellular & Molecular Immunology*, 7, 485-490.
- WANG, H., FENG, X., YAN, W. & TIAN, D. 2020. Regulatory T Cells in Autoimmune Hepatitis: Unveiling Their Roles in Mouse Models and Patients. *Front Immunol*, 11, 575572.
- WANG, L., WANG, F.-S. & GERSHWIN, M. E. 2015. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *Journal of Internal Medicine*, 278, 369-395.
- WEI, Y., LI, Y., YAN, L., SUN, C., MIAO, Q., WANG, Q., XIAO, X., LIAN, M., LI, B., CHEN, Y., ZHANG, J., LI, Y., HUANG, B., LI, Y., CAO, Q., FAN, Z., CHEN, X., FANG, J.-Y., GERSHWIN, M. E., TANG, R. & MA, X. 2020. Alterations of gut microbiome in autoimmune hepatitis. *Gut*, 69, 569-577.
- WEILER-NORMANN, C., SCHRAMM, C., QUAAS, A., WIEGARD, C., GLAUBKE, C., PANNICKE, N., MÖLLER, S. & LOHSE, A. W. 2013. Infliximab as a rescue treatment in difficult-to-treat autoimmune hepatitis. *J Hepatol*, 58, 529-34.
- WEISMÜLLER, T. J., TRIVEDI, P. J., BERGQUIST, A., IMAM, M., LENZEN, H., PONSIOEN, C. Y., HOLM, K., GOTTHARDT, D., FÄRKILÄ, M. A., MARSCHALL, H. U., THORBURN, D., WEERSMA, R. K., FEVERY, J., MUELLER, T., CHAZOUILLÈRES, O., SCHULZE, K., LAZARIDIS, K. N., ALMER, S., PEREIRA, S. P., LEVY, C., MASON, A., NAESS, S., BOWLUS, C. L., FLOREANI, A., HALILBASIC, E., YIMAM, K. K., MILKIEWICZ, P., BEUERS, U., HUYNH, D. K., PARES, A., MANSER, C. N., DALEKOS, G. N., EKSTEEN, B., INVERNIZZI, P., BERG, C. P., KIRCHNER, G. I., SARRAZIN, C., ZIMMER, V., FABRIS, L., BRAUN, F., MARZIONI, M., JURAN, B. D., SAID, K., RUPP, C., JOKELAINEN, K., BENITO DE VALLE, M., SAFFIOTI, F., CHEUNG, A., TRAUNER, M., SCHRAMM, C., CHAPMAN, R. W., KARLSEN, T. H., SCHRUMPF, E., STRASSBURG, C. P., MANNS, M. P., LINDOR, K. D., HIRSCHFELD, G. M., HANSEN, B. E. & BOBERG, K. M. 2017. Patient Age, Sex, and Inflammatory Bowel Disease Phenotype Associate With Course of Primary Sclerosing Cholangitis. *Gastroenterology*, 152, 1975-1984.e8.
- WILDIN, R. S., RAMSDELL, F., PEAKE, J., FARAVELLI, F., CASANOVA, J.-L., BUIST, N., LEVY-LAHAD, E., MAZZELLA, M., GOULET, O., PERRONI, L., DAGNA BRICARELLI, F., BYRNE, G., MCEUEN, M., PROLL, S., APPLEBY, M. & BRUNKOW, M. E. 2001. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nature Genetics*, 27, 18-20.
- WILKIN, F., DUHANT, X., BRUYNS, C., SUAREZ-HUERTA, N., BOEYNAEMS, J. M. & ROBAYE, B. 2001. The P2Y11 receptor mediates the ATP-induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, 166, 7172-7.

- WILLIAMS, L. M. & RUDENSKY, A. Y. 2007. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol*, 8, 277-84.
- WILLIAMS, M. A., TYZNIK, A. J. & BEVAN, M. J. 2006. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature*, 441, 890-3.
- WILSON, C. B., ROWELL, E. & SEKIMATA, M. 2009. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol*, 9, 91-105.
- WING, K., ONISHI, Y., PRIETO-MARTIN, P., YAMAGUCHI, T., MIYARA, M., FEHERVARI, Z., NOMURA, T. & SAKAGUCHI, S. 2008. CTLA-4 Control over Foxp3⁺ Regulatory T Cell Function. *Science*, 322, 271-275.
- WOHLFERT, E. & BELKAID, Y. 2010. Plasticity of T reg at infected sites. *Mucosal Immunol*, 3, 213-5.
- WONG, M., LA CAVA, A. & HAHN, B. H. 2013. Blockade of programmed death-1 in young (New Zealand Black x New Zealand White)F1 mice promotes the suppressive capacity of CD4+ regulatory T cells protecting from lupus-like disease. *J Immunol*, 190, 5402-10.
- WUEST, T. Y., WILLETTE-BROWN, J., DURUM, S. K. & HURWITZ, A. A. 2008. The influence of IL-2 family cytokines on activation and function of naturally occurring regulatory T cells. *J Leukoc Biol*, 84, 973-80.
- XING, Y. & HOGQUIST, K. A. 2012. T-cell tolerance: central and peripheral. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4.
- YAMAZAKI, T., YANG, X. O., CHUNG, Y., FUKUNAGA, A., NURIEVA, R., PAPPU, B., MARTIN-OROZCO, N., KANG, H. S., MA, L., PANOPOULOS, A. D., CRAIG, S., WATOWICH, S. S., JETTEN, A. M., TIAN, Q. & DONG, C. 2008. CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells. *J Immunol*, 181, 8391-401.
- YANG, B. H., HAGEMANN, S., MAMARELI, P., LAUER, U., HOFFMANN, U., BECKSTETTE, M., FÖHSE, L., PRINZ, I., PEZOLDT, J., SUERBAUM, S., SPARWASSER, T., HAMANN, A., FLOESS, S., HUEHN, J. & LOCHNER, M. 2016. Foxp3(+) T cells expressing ROR γ t represent a stable regulatory T-cell effector lineage with enhanced suppressive capacity during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol*, 9, 444-57.
- YANG, X. O., NURIEVA, R., MARTINEZ, G. J., KANG, H. S., CHUNG, Y., PAPPU, B. P., SHAH, B., CHANG, S. H., SCHLUNS, K. S., WATOWICH, S. S., FENG, X. H., JETTEN, A. M. & DONG, C. 2008. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity*, 29, 44-56.
- YOUNOSSI, Z. M., BERNSTEIN, D., SHIFFMAN, M. L., KWO, P., KIM, W. R., KOWDLEY, K. V. & JACOBSON, I. M. 2019. Diagnosis and Management of Primary Biliary Cholangitis. *Am J Gastroenterol*, 114, 48-63.
- YU, L., REWERS, M., GIANANI, R., KAWASAKI, E., ZHANG, Y., VERGE, C., CHASE, P., KLINGENSMITH, G., ERLICH, H., NORRIS, J. & EISENBARTH, G. S. 1996. Antiislet autoantibodies usually develop sequentially rather than simultaneously. *J Clin Endocrinol Metab*, 81, 4264-7.
- YU, N., LI, X., SONG, W., LI, D., YU, D., ZENG, X., LI, M., LENG, X. & LI, X. 2012. CD4(+)CD25(+)CD127 (low/-) T cells: a more specific Treg population in human peripheral blood. *Inflammation*, 35, 1773-80.
- YU, X., ROLLINS, D., RUHN, K. A., STUBBLEFIELD, J. J., GREEN, C. B., KASHIWADA, M., ROTHMAN, P. B., TAKAHASHI, J. S. & HOOPER, L. V. 2013. TH17 cell differentiation is regulated by the circadian clock. *Science*, 342, 727-30.
- ZHANG, Y., LUO, X. Y., WU, D. H. & XU, Y. 2015. ROR nuclear receptors: structures, related diseases, and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin*, 36, 71-87.
- ZHAO, L., TANG, Y., YOU, Z., WANG, Q., LIANG, S., HAN, X., QIU, D., WEI, J., LIU, Y., SHEN, L., CHEN, X., PENG, Y., LI, Z. & MA, X. 2011. Interleukin-17 contributes to the pathogenesis of autoimmune hepatitis through inducing hepatic interleukin-6 expression. *PLoS one*, 6, e18909-e18909.
- ZHOU, L., CHONG, M. M. W. & LITTMAN, D. R. 2009. Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity*, 30, 646-655.

- ZHOU, L., LOPES, J. E., CHONG, M. M., IVANOV, II, MIN, R., VICTORA, G. D., SHEN, Y., DU, J., RUBTSOV, Y. P., RUDENSKY, A. Y., ZIEGLER, S. F. & LITTMAN, D. R. 2008. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing ROR γ function. *Nature*, 453, 236-40.
- ZHU, L., SONG, H., ZHANG, L. & MENG, H. 2019. Characterization of IL-17-producing Treg cells in type 2 diabetes patients. *Immunol Res*, 67, 443-449.
- ZORN, E., NELSON, E. A., MOHSENI, M., PORCHERAY, F., KIM, H., LITSA, D., BELLUCCI, R., RADERSCHALL, E., CANNING, C., SOIFFER, R. J., FRANK, D. A. & RITZ, J. 2006. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood*, 108, 1571-9.

10 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Johannes Herkel und meiner Betreuerin Dr. Antonella Carambia für die Konzeption des Themas, die enge wissenschaftliche Betreuung, ihr konstruktives Feedback und das stets angenehme Arbeitsklima bedanken. Diese Doktorarbeit war für mich eine wertvolle Möglichkeit, einen Einstieg in die experimentelle Forschung zu bekommen und wissenschaftliches Arbeiten praktisch umzusetzen. Die engagierte kontinuierliche Begleitung sowie die Möglichkeit, das Projekt eigenständig mitgestalten zu können, weiß ich sehr zu schätzen.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Ansgar Lohse, für die Möglichkeit meine Promotion in der I. Medizinischen Klinik des UKEs durchführen zu können. Ebenfalls bedanke ich mich bei dem ärztlichen Team der Klinik, insbesondere bei den Kolleg:innen in der Leberambulanz für die Umsetzung der Probengewinnung.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an Dr. Max Preti, der mir sehr geduldig und mit einem stets offenen Ohr bei der Planung und Auswertung der Experimente beratend zur Seite stand. Ebenso danke ich Dr. Miriam Schakat und Nina Verse für die methodische Vorarbeit zu meinem Projekt und die Einarbeitung im Labor. Generell hat das gesamte Team aus O58 sehr dazu beigetragen, dass diese Promotion für mich eine bereichernde Erfahrung dargestellt hat und ich immer gerne ins Labor gekommen bin. Vielen Dank für den wertschätzenden Austausch, die Unterstützung und das überaus nette Miteinander.

Darüber hinaus möchte ich mich für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg des Sonderforschungsbereiches 841 „Entzündung und Regeneration“ bedanken. Die finanzielle Unterstützung und das wissenschaftliche Rahmenprogramm haben mir geholfen, diese Arbeit erfolgreich durchführen zu können.

Zuletzt danke ich meinen Eltern und meiner Schwester von Herzen dafür, dass sie immer an meiner Seite sind, mich bedingungslos unterstützen und an mich glauben.

11 Lebenslauf

Name Leona Jansing
 Geburtsdatum 31.12.1993
 Geburtsort Dülmen

Berufliche Laufbahn

seit 01/2024 Ärztin in Basisausbildung
 Tauernklinikum Zell am See (AT)

04 - 10/2023 Assistenzärztin Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie
 Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

2021 - 2022 Praktisches Jahr

- Chirurgie: Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
- Plastische Chirurgie: BG Unfallklinik Ludwigshafen
- Innere Medizin: Westküstenklinikum Heide und Centre hospitalier Bienne (CH)

2016 - 2021 Famulaturen im Rahmen des Medizinstudiums

2013 - 2016 Duale Studentin – Unternehmensberatung
 Ernst & Young GmbH, Hamburg & London (GB)

Studium

2016 - 2022 Humanmedizin
 Universität Hamburg

2013 - 2016 B.A. International Business
 Duale Hochschule Baden-Württemberg, Mannheim

Studienbegleitende Tätigkeiten

2020 - 2022 Werkstudentin
 Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

2019 - 2022 Studentische Aushilfe
 Diaverum MVZ Schlankreye, Hamburg

2016 - 2019 Werkstudentin
 Schön Klinik Hamburg Eilbek

Stipendien

03 – 10/2020 Förderung der Promotion durch den Sonderforschungsbereich
 841 „Entzündung und Regeneration“, Teilnahme am
 Graduiertenkolleg

Schulische Laufbahn

2004 - 2013 Allgemeine Hochschulreife
 Mariengymnasium, Bocholt

12 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Leona Jansing